



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CFM-CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)**



**Preparação de Dibenzalacetonas e Estudos de Reações de  
Bio-hidrogenação Mediada por *Saccharomyces cerevisiae***

**Kamila dos Santos Maguerroski**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento**

**Co-orientadora: Vanessa Dutra Silva**

***Florianópolis, novembro de 2009***

**Kamila dos Santos Maguerroski**

**Preparação de Dibenzalacetonas e Estudos de Reações de  
Bio-hidrogenação Mediada por *Saccharomyces cerevisiae***

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial para aprovação na  
disciplina de Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento**

**Co-orientadora: Doutoranda Vanessa Dutra Silva**

*Florianópolis, novembro de 2009*

**Kamila dos Santos Maguerroski**

**Preparação de Dibenzalacetonas e Estudos de Reações de  
Bio-hidrogenação Mediada por *Saccharomyces cerevisiae***

---

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente  
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento  
Orientador

---

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes

---

Prof. Dr. Tiago A. S. Brandão

*Florianópolis, novembro de 2009*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aquelas pessoas que me apoiaram nessa jornada de algum modo, e minhas desculpas aqueles que por ventura minha memória não puder lembrar.

✓ À minha família por todo o amor, dedicação e compreensão que recebi durante toda a minha vida.

✓ À professora Maria da Graça Nascimento pela amizade, paciência e confiança depositada em mim, durante a realização e orientação deste trabalho. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor !!!

✓ À minha co-orientadora Vanessa Dutra Silva, pela ajuda, amizade, paciência e dedicação á esse nosso projeto.

✓ Ao meu amigo e irmão Kevin, pela paciência de sempre estar disposto a me ouvir, e de zelar por mim durante o curso.

✓ Ao meu companheiro e amigo Juan que esteve durante todos esses anos de curso me apoiando em todos os momentos.

✓ Aos colegas e amigos do laboratório 301/306, Damianni, Thiago, Cristiane, Isabel, Rosana, Giovanni e Simone.

✓ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

✓ Aos Professores Faruk Nome e Eduardo Carasek da Rocha e os doutorandos Jacks Priebe e Edmar Martendal pelas análises de CG-EM

✓ Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho.

✓ Á aquelas pessoas que semearam algo de bom na minha vida, essas guardarei com carinho em minha memória.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xiii
RESUMO.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1. Considerações Gerais .....	2
2.2. Enzimas .....	2
2.3. Classificação das enzimas.....	4
2.4. Imobilização de Enzimas .....	6
2.5. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e suas aplicações.....	7
2.6. Compostos carbonílicos $\alpha,\beta$ - insaturados.....	8
3. OBJETIVOS .....	10
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos .....	10
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	11
4.1. Reagentes, solventes e biocatalisador: .....	11
4.2. Técnicas de caracterização .....	11
4.3. Procedimento geral para preparação das dibenzalacetonas ( <b>17-22</b> ).....	12
4.4. Procedimento geral para redução dos compostos <b>17-19</b> via química.....	14
4.5. Procedimento geral de bio-hidrogenação da (1 <i>E</i> -4 <i>E</i> )-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona ( <b>17</b> ) .....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	16
5.1. Preparação das dibenzalacetonas ( <b>17-21</b> ) .....	16

5.2. Redução dos compostos <b>17-21</b> <i>via</i> química com NaBH <sub>4</sub> .....	20
5.3. Reações de bio-hidrogenação das dibenzalacetonas <b>17-21</b> utilizando <b>FP</b> .....	21
5.3.1. Influência da massa de <b>FP</b> e do tempo reacional da biotransformação de <b>17</b> . ....	25
5.3.2. Influência da concentração do substrato.....	26
5.3.3. Influência da temperatura e pH .....	27
5.3.4. Influência da agitação na bio-hidrogenação de <b>17</b> .....	28
5.3.5. Resultados preliminares da bio-hidrogenação das dibenzalacetonas <b>18-21</b> com <b>FP</b> .....	30
6. CONCLUSÕES .....	33
7. PERSPECTIVAS .....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
9. ANEXO .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do modelo enzimático chave-fechadura <sup>14</sup> .....	3
Figura 2- Redução do $\beta$ -cetoester acíclico mediada com <b>FP</b> . <sup>13</sup> .....	5
Figura 3- Redução da 2-cloroacetofenona mediada por <i>R. oryzae</i> na presença de glicerol. <sup>21</sup> .....	6
Figura 4- Imagens de células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <sup>27</sup> .....	7
Figura 5a e b- Reduções mediadas por <i>S. cerevisiae</i> (adaptada da refs. 19 e 28).....	7
Figura 6- Redução microbiológica mediada por <i>Rhodotorula rubra</i> M18D3 (adap. da ref. 32). .....	8
Figura 7- Bio-hidrogenação da chalcona <b>15</b> catalisada por <b>FP</b> . (adaptado da ref. 15)9	
Figura 8- Redução dos substratos <b>17–19</b> via química. ....	15
Figura 9- Sistema bifásico usado nas reações de bio-hidrogenação. ....	15
Figura 10- Síntese dos compostos carbonílicos $\alpha,\beta$ -insaturados ( <b>17-21</b> ).....	16
Figura 11- Espectro de infravermelho de <b>17</b> . [pastilha de KBr] .....	18
Figura 12- Cromatograma de CG-quiral do composto <b>17</b> . [condições operacionais: inj.=250°C, Det.=275°C, Ti =100°C, Tf = 230°C, $\Delta$ aq.1 =20°C/min, pH2 = 75kPa] .....	19
Figura 13- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona. [CDCl <sub>3</sub> , 400MHz] .....	19
Figura 14- Possibilidades de formação dos produtos nas reações de bio-hidrogenação dos compostos <b>17-21</b> , mediadas por <b>FP</b> .....	21
Figura 15- Sobreposição dos cromatogramas do composto <b>17</b> (pico C); bio-hidrogenado com <b>FP</b> (pico A e B) e seu álcool <b>22</b> (pico D). [Parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 2] .....	22
Figura 16- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de <b>17</b> mediada por <b>FP</b> em sistema bifásico. [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz] .....	22
Figura 17- Produtos obtidos na reação de bio-hidrogenação de <b>17</b> medida por <b>FP</b> .	23
Figura 18- Cromatogramas e espectros de massa de uma alíquota da reação de <b>17</b> mediada por <b>FP</b> em sistema bifásico, 35 °C, 24 h. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 2] .....	24

Figura 19- Influência da massa de <b>FP</b> e o tempo reacional na bio-hidrogenação de <b>17</b> . [1 mmol de substrato, 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 5,5); 35 °C] .....	25
Figura 20- Efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de <b>17</b> catalisada por <b>FP</b> em sistema bifásico. [condições reacionais: 4 g biocatalisador, 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de solução tampão K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /ácido cítrico (0,2 M/0,1 M pH 5,5), agitação magnética, á 35 °C) .....	26
Figura 21a-b- Influência do pH (a) e da temperatura (b) na reação de bio-hidrogenação de <b>17</b> , produto <b>26</b> (●) e produto <b>27</b> (■) [4 g de <b>FP</b> , 17 mmolL <sup>-1</sup> de <b>17</b> , 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M), 24 h]. .....	27
Figura 22- Valores de conversões em <b>26</b> (□,○,◇) e <b>27</b> (■,●,◆) em função do tempo reacional, com agitação magnética (○,●), paralela (□,■) e orbital (◇,◆).....	28
Figura 23- Valores de conversão em <b>26</b> (■) e <b>27</b> (■) em função da velocidade de agitação (RPM). [4 g de <b>FP</b> , 17 mmolL <sup>-1</sup> do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30mL de tampão ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M, pH 5,5, 4 h, 35 °C] .....	29
Figura 24- Equação da reação de bio-hidrogenação de <b>18</b> mediada por <b>FP</b> . [4 g de <b>FP</b> , 17 mmolL <sup>-1</sup> do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30mL de tampão ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M), pH 5,5, 4 h, 35 °C, agitação magnética, 400 rpm, 4 h] .....	30
Figura 25a-b- Espectros de RMN- <sup>1</sup> H do substrato <b>18</b> (a) e de uma alíquota da reação de <b>18</b> (b). [4 g de <b>FP</b> , 17 mmolL <sup>-1</sup> do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30mL de tampão ácido cítrico/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M), pH 5,5, 4 h, 35 °C, agitação magnética, 400 rpm, 4 h] .....	31
Figura 26- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da dibenzalacetona <b>18</b> . [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz].....	38
Figura 27- Espectro de IV da dibenzalacetona <b>18</b> . [pastilha de KBr] .....	38
Figura 28- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da dibenzalacetona <b>19</b> . [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz].....	39
Figura 29- Espectro de IV da dibenzalacetona <b>19</b> . [pastilha de KBr] .....	39
Figura 30- Espectro de IV da dibenzalacetona <b>20</b> . [pastilha de KBr] .....	40
Figura 31- Espectro de IV da dibenzalacetona <b>21</b> . [pastilha de KBr] .....	40
Figura 32- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do álcool <b>22</b> . [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz] .....	41
Figura 33- Espectro de IV do álcool <b>22</b> . [pastilha de KBr] .....	41
Figura 34- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do álcool <b>23</b> . [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz] .....	42
Figura 35- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do álcool <b>24</b> . [CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz] .....	42



Figura 36- Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da bio-hidrogenação de **18**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz] .....43

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das enzimas de acordo com a UIBMB .....	4
Tabela 2- Condições de programação do CG-quiral e CG-EM .....	12
Tabela 3- Dados analíticos dos compostos <b>17-21</b> .....	17
Tabela 4- Dados analíticos para os álcoois <b>22-24</b> .....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	= Alfa
$\beta$	= Beta
$\gamma$	= Gama
<b>RPM</b>	= Rotação por minuto
<b>CCD</b>	= Cromatografia de camada delgada
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	= Clorofórmio deuterado
<b>CG</b>	= Cromatografia gasosa
<b>CG-EM</b>	= Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
<b>CG-quiral</b>	= Cromatografia gasosa de fase quiral
<b>ee.</b>	= Excesso enantiomérico
<b>FP</b>	= Fermento de pão comercial
<b>IV</b>	= Infravermelho
<b>MHz</b>	= Mega Hertz (10 <sup>6</sup> Hertz)
<b>NADH</b>	= Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	= Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>pf</b>	= Ponto de fusão
<b>R<sub>f</sub></b>	= Fator de retenção
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	= Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	= <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>TMS</b>	= Tetrametilsilano
<b>t<sub>R</sub></b>	= Tempo de retenção
<b>UIBBM</b>	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
$\delta$	= Deslocamento ou delta

## RESUMO

Neste trabalho foram sintetizados derivados de benzaldeídos com acetona denominados de dibenzalacetonas constituídas pelos substituintes H (**17**), *p*-OCH<sub>3</sub> (**18**), *p*-NO<sub>2</sub> (**19**), 3,4-(O-CH<sub>2</sub>-O-) (**20**), *p*-CN (**21**), por condensação aldólica catalisada por base. Estes compostos foram utilizados como substratos nas reações de biotransformação mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão, **FP**) em sistema bifásico. Os compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados foram obtidos com rendimentos de 18-74% e foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H, IV e ponto de fusão. Estes substratos foram reduzidos *via* química com NABH<sub>4</sub> para a obtenção dos correspondentes álcoois (**22-24**). A biotransformação do composto **17** mediada por fermento de pão foi quimiosseletiva, formando apenas as correspondentes cetonas saturadas **26** e **27**. Na reação de bio-hidrogenação da dibenzalacetona **17**, foram avaliados diversos parâmetros reacionais tais como massa da levedura, concentração do substrato, temperatura, pH, tipos e velocidades de agitação (RPM). As maiores conversões em **27**, foram obtidas com 4 g e 6 g de **FP**, com 17 mmol/L do substrato, a 35 °C e em pH 5,5. O estudo da agitação se mostrou de grande importância nas reações biocatalisadas em sistema bifásico. As maiores conversões em **27** foram obtidas quando utilizou-se a agitação magnética com auxílio de barra magnética, sendo de 86% durante 24 h. Verificou-se nos estudos da velocidade de agitação, que quando a reação foi realizada em 400 e 500 rpm, os dois produtos **26** e **27** foram obtidos com conversões semelhantes, sendo de ~50%. Quando realizou-se a biotransformação dos substratos **19-21** mediada por **FP** em sistema bifásico, não foi possível observar a formação de nenhum produto. Quando a reação foi realizada com a dibenzalacetona **18**, foi possível observar a formação da cetona saturada **29**. Concluindo, o uso da levedura *S. cerevisiae* como biocatalisador na biotransformação de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados em sistema bifásico, mostrou-se uma alternativa viável para a obtenção de cetonas saturadas, sendo usadas em condições brandas de reação, reagentes de custo relativamente baixo, além de ser um método ecologicamente correto.

**Palavras-chave:** compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados; *Saccharomyces cerevisiae*; biocatálise

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A utilização de agentes biológicos nos processos industriais apresenta ganhos consideráveis quanto a preservação e redução de impactos no meio ambiente gerados pelos processos químicos clássicos. Assim, a biocatálise desempenha importante papel com a utilização de microorganismos e enzimas como catalisadores, os quais possuem um alto grau de especificidade em relação aos substratos, originando uma maior pureza do produto.<sup>1</sup>

Por muitos anos na indústria, o uso de biocatalisadores enzimáticos não era freqüente, pois apresentavam desvantagens como instabilidade do seu uso em determinados solventes, condições de pH, temperatura, exposição a agentes desnaturantes e a necessidade da adição de cofatores. Estas limitações estão sendo superadas por estudos de interesse acadêmico, com objetivo de sustentar a procura em escala industrial.<sup>2</sup>

Para obtenção de um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo catalítico foi necessário o desenvolvimento de métodos preventivos específicos de imobilização catalítica. A imobilização de enzimas pode ocorrer através da adsorção ou ligação de enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica.<sup>3,4</sup>

Um outro método de imobilização usado em reações biocatalíticas é o sistema bifásico. Facilidade na separação do biocatalisador do produto obtido e a biotransformação de substratos de interesse de baixa polaridade são algumas das vantagens do uso crescente desse método, na área de estudos dos químicos orgânicos.<sup>5,7</sup>

Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas são geralmente obtidas de microorganismos (bactérias, fungos e leveduras). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida e utilizada como fermento de pão (FP) na produção de bebidas alcoólicas tem sido o microorganismo mais empregado pelos químicos em síntese orgânica, principalmente na redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos e compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Esta levedura tem sido reportada há muito tempo como catalisador de transformações que geram produto quirais e pode ser considerada como ideal pelo fato de estar amplamente disponível e ser de fácil manuseio.<sup>2,6,7</sup>

No trabalho proposto foram inicialmente preparadas e caracterizadas por técnicas espectroscópicas (IV, RMN-<sup>1</sup>H) e ponto de fusão, compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados derivados de benzaldeídos e acetona, denominadas de dibenzalacetonas. A seguir foram estudadas reações de bio-hidrogenação destes substratos mediadas por *S. cerevisiae* comercial, em sistema bifásico. Foram avaliadas diferentes condições experimentais, tais como, a massa de **FP**, massa do substrato, tempo, temperatura, pH, modo e velocidade de agitação.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Considerações Gerais

A aplicação de processos biológicos, em particular aqueles mediados por leveduras, é conhecida pela humanidade há milhares de anos para produção de pão, laticínios e bebidas alcoólicas. Os primeiros relatos de processos fermentativos pelas civilizações antigas referem-se a fermentação de cereais em grãos para produção de bebida alcoólica pelos sumérios e babilônios há cerca de 6000 a.C. Apesar dessas aplicações o conhecimento dos agentes responsáveis por esses processos eram desconhecidos, porém em 1852, após a invenção do microscópio, Louis Pasteur estabeleceu uma base científica destas antigas aplicações, provando que as fermentações eram feitas por microorganismos, e que cada processo fermentativo era característico de um tipo particular de organismo.<sup>1,2</sup>

A levedura *S. cerevisiae*, conhecida também como fermento de pão (FP), é um dos biocatalisadores mais utilizados pelos químicos orgânicos. A ação redutora desta levedura foi observada pela primeira vez por Dumas em 1874, sendo atualmente empregada em pesquisas biotecnológicas na produção de bioetanol, obtendo rendimentos consideráveis em produtos.<sup>2,8,9</sup>

O uso da biocatálise encontra-se atualmente em amplo desenvolvimento nas pesquisas do ramo químico e biológico, tendo como principal objetivo o desenvolvimento de novos catalisadores para o uso industrial, além da diminuição do impacto ambiental, interesse este que vem sendo explorado pela química verde.<sup>7,10</sup>

### 2.2. Enzimas

As enzimas, em geral, são proteínas que atuam na biocatálise alterando a velocidade da reação, através da diminuição da energia livre de ativação. Uma reação na presença de enzimas acelera sua velocidade na ordem de  $10^{10}$  -  $10^{23}$  maior do que em uma reação na ausência da mesma. Toda enzima possui um local denominado de sítio ativo onde se processam as reações da enzima com seu determinado substrato. A enzima e o substrato são mantidos juntos por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outros, sendo o

sítio ativo responsável por essa interação, proporcionando a especificidade da enzima e ocasionando a diferenciação das enzimas de outros tipos de catalisadores.<sup>2, 11-13</sup>

A **Figura 1** apresenta o esquema do modelo chave-fechadura, fator que determina sua especificidade.



**Figura 1-** Representação esquemática do modelo enzimático chave-fechadura<sup>14</sup>

A biocatálise mediada por enzimas possui grande eficiência sendo de fácil reprodução no laboratório, possuindo a capacidade de atuar em geral sob condições brandas na temperatura de 37 °C e  $\text{pH} \cong 7,0$ , e apresentam diversos tipos de seletividades, tais como, quimiosseletividade, regiosseletividade e enantiosseletividade.<sup>7,8</sup> Muitas enzimas conseguem atuar em biotransformações de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis.<sup>1,13</sup>

Uma desvantagem proveniente do uso das enzimas em processos biocatalisados é a sua inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, havendo a necessidade de estabilizar estes biocatalisadores. As técnicas mais conhecidas para contornar estes problemas são os métodos de imobilização, proteção com a presença de água na reação formando os chamados “sistemas bifásico”, adição de inibidores, utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas) e o uso de líquidos iônicos.<sup>5,7,13,15,16</sup>

## 2.3. Classificação das enzimas

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se registrados 61.086 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico). Várias enzimas têm sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-<sup>2</sup>D.<sup>17</sup>

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as enzimas são classificadas em seis grandes classes e suas subclasses, de acordo com o tipo de reação que catalisa.<sup>11,13</sup> **(Tabela 1)**

**Tabela 1-** Classificação das enzimas de acordo com a UIBMB

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	<b><i>Oxirredutases</i></b>	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Desidrogenases, oxidases, peroxidases
2	<i>Transferases</i>	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases
3	<i>Hidrolases</i>	Reações de hidrólise	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases
4	<i>Liases</i>	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoacidolias, hidrolase
5	<i>Isomerases</i>	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, oxirredutases, mutase
6	<i>Ligases</i>	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	

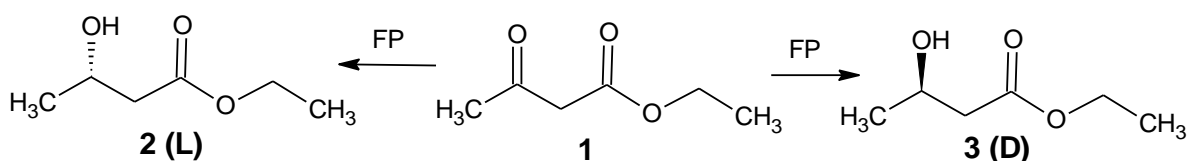
A levedura *S. cerevisiae*, utilizada neste trabalho, contém enzimas da classe das *oxidorredutases*, que é considerada a segunda maior classe utilizada em síntese orgânica.<sup>5,13</sup> Estas são classificadas dentro de três classes: desidrogenases (ou redutases), oxigenases e oxidases,<sup>12,13</sup> e formam um grupo de enzimas de utilização abrangente na redução de carbonilas de aldeídos e cetona (C=O),<sup>2,18</sup> da ligação dupla carbono-carbono (C=C),<sup>19</sup> e mais recentemente na redução assimétrica de aril iminas (C=N).<sup>20</sup> As oxidorredutases possuem a capacidade de transformar



substratos pró-quirais em produtos quirais opticamente puros, sendo de grande importância a sua utilização na síntese orgânica.<sup>4,5,19,20</sup>

As enzimas da classe das desidrogenases são as que substituem o borohidreto de sódio nas reações de redução da carbonila e da ligação C=C. Portanto, elas utilizam como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida (NADH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida (NADPH), que tem elevado custo. Para contornar este problema o uso de microorganismos vivos íntegros tem sido uma alternativa para catalisar estas reações em química orgânica.<sup>10,13</sup>

Além do uso de leveduras em reações de redução de grupos carbonílicos, fungos e bactérias também vêm sendo utilizados. A **Figura 2** mostra a redução do β-cetoester acíclico **1** mediada por fermento de pão. Esta reação resulta na redução da C=O, formando o composto **2** com excesso enantiomérico de 96% e de configuração L.<sup>1</sup>

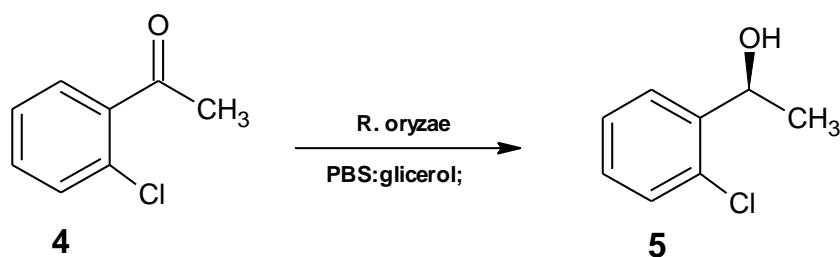


**Figura 2-** Redução do β-cetoester acíclico mediada com FP.<sup>13</sup>

Portanto, ao utilizar um catalisador biológico obteve-se majoritariamente um dos enantiômeros, sendo esta uma das vantagens do método.<sup>13</sup>

Recentemente, Andrade e col. estudaram a atuação enzimática do microorganismo *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus terreus*, e o efeito da adição de glicerol, na bio-redução enantioseletiva de cetonas aromáticas.

A **Figura 3** mostra a bio-redução da 2-cloroacetofenona (**4**) utilizando a *R. oryzae*, na presença de glicerol como co-solvente e tampão fosfato de sódio e potássio pH 7,0 (PBS). Foi verificado que quando a reação foi realizada na presença de solução tampão, o produto **5-S** foi obtido com e.e. 94%. Com adição de glicerol, na proporção de glicerol:PBS,1:4, o produto foi obtido com e.e. 97%, mostrando que esta mistura de solventes é favorável para reduções biocatalisadas.<sup>21</sup>



**Figura 3-** Redução da 2-cloroacetofenona mediada por *R. oryzae* na presença de glicerol.<sup>21</sup>

## 2.4. Imobilização de Enzimas

As enzimas e os microorganismos estão sujeitos a diminuição ou ausência de sua atividade por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o seu uso. Para eliminar esses efeitos desfavoráveis foi necessário o desenvolvimento de métodos preventivos específicos.<sup>5,13</sup>

As técnicas de imobilização são altamente aplicadas em reações biocatalisadas em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, proporcionando a reutilização do biocatalisador, aumento da sua estabilidade, redução de custos e o aumento, em alguns casos, da atividade enzimática. Esses fatores dependem da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização.<sup>4,5,22,23</sup>

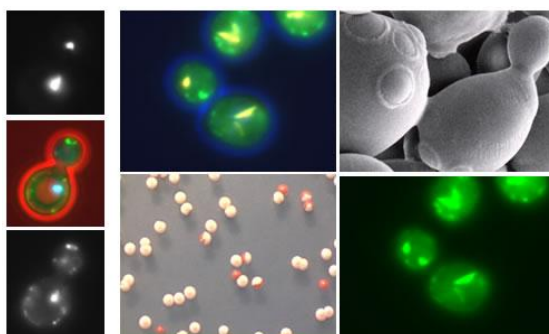
A imobilização de enzimas pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica.<sup>4,23,24</sup>

O uso do sistema bifásico como um método de imobilização e/ou proteção enzimática vem sendo muito utilizado na biocatálise, devido a pouca solubilidade de alguns substratos de interesse comercial no meio aquoso que podem ser potencialmente biotransformados por enzimas ou microorganismos. Este sistema é formado por uma fase aquosa onde o microorganismo é suspenso e por uma fase orgânica onde o substrato orgânico está presente, necessitando de agitação mecânica contínua para que ocorra a reação. O aumento do rendimento do processo reacional devido a catálise, facilidade de separação dos produtos e reutilização dos catalisadores são as principais vantagens do uso desse método.<sup>3,7,15,25</sup>

## 2.5. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e suas aplicações

Como já citado o fermento de pão (**FP**), *S. cerevisiae*, é um dos biocatalisadores mais utilizados pelos químicos orgânicos, devido principalmente a sua alta disponibilidade e baixo custo. Outras vantagens tais como alta seletividade, facilidade de manuseio, rendimentos químicos compatíveis e alta eficiência em relação aos catalisadores tradicionais, proporcionam o crescente interesse das pesquisas na área acadêmica e industrial.<sup>2,8,26</sup>

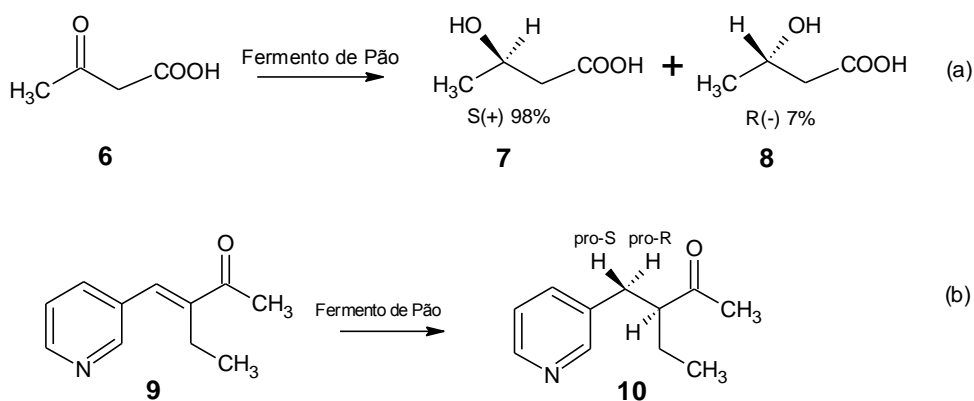
A **Figura 4** mostra imagens de células de *S. cerevisiae* obtidas na Universidade de Biociências de Kent.<sup>27</sup>



**Figura 4-** Imagens de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>27</sup>

Este microorganismo é capaz de catalisar vários tipos de reações tais como redução, condensação, ciclização e oxidação.<sup>2,8,26,28-30</sup>

A ação destes microorganismos na redução do acetoacetato de etila (**6**) e na bio-hidrogenação do (3*E*)-3-etil-4-(3-piridil)-3-buten-2-ona (**9**) já foi reportado na literatura para a produção de compostos quirais e enantiomericamente puros, sendo estas características de importância para as pesquisas nos setores acadêmicos e industriais (**Figuras 5a e b**).<sup>19,28</sup>



**Figura 5a e b-** Reduções mediadas por *S. cerevisiae* (adaptada da refs. 19 e 28).

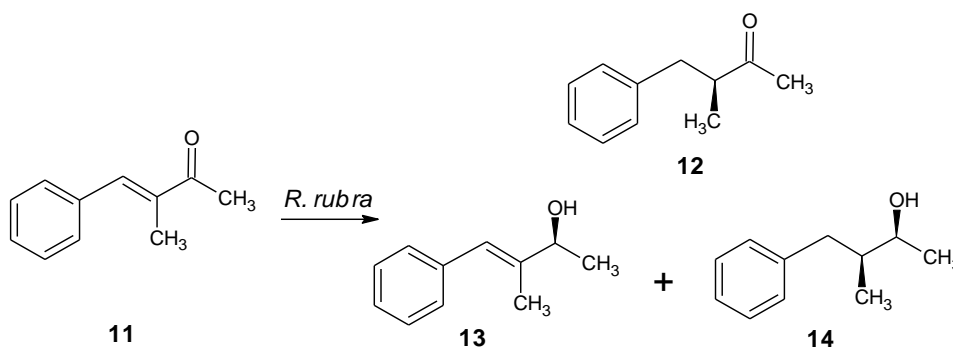
Em um estudo recente a levedura *S. cerevisiae* modificada e termoresistente foi usada para a produção bioetanol através da fermentação do açúcar proveniente de um material lignocelulósico a 35-45 °C.<sup>8</sup>

A redução assimétrica de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados mediada por esses microorganismos também são objeto de estudo para a produção de compostos quirais enantiomericamente puros.<sup>2,13</sup>

## 2.6. Compostos carbonílicos $\alpha,\beta$ - insaturados

A reação de redução dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$  - insaturados derivados de cetonas e aldeídos pode resultar na competitividade na catálise da C=C e/ou C=O, sendo regioseletiva na presença de catalisadores específicos. Essa reação pode resultar na redução completa do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado com a formação do álcool saturado, redução específica da carbonila levando ao álcool alílico correspondente ou hidrogenação exclusiva da ligação C=C com formação do aldeído ou cetona saturado.<sup>31</sup>

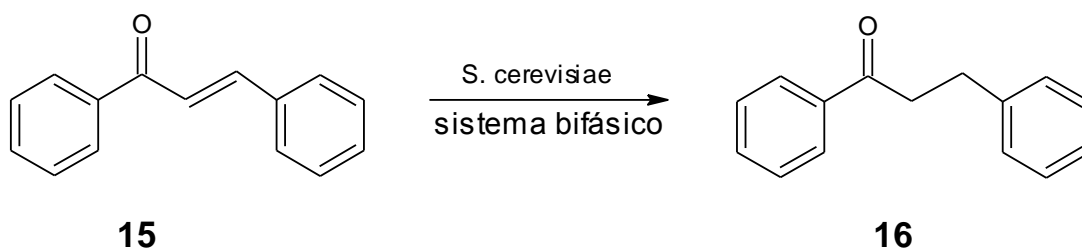
Os microorganismos *S. cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* M18D3 e *Saccharum officinarum* (cana de açúcar) vem sendo utilizados na redução enantiosseletiva dos compostos carbonílicos, a fim de adquirir produtos com alta seletividade e pureza enantiomérica.<sup>32-34</sup> Na **Figura 6**, observa-se a reação de redução de 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (**11**) na presença de *Rhodotorula rubra* M18D3 em meio aquoso formando a cetona quiral saturada (**12**), o álcool insaturado (**13**) e o saturado (**14**).



**Figura 6-** Redução microbiológica mediada por *Rhodotorula rubra* M18D3 (adap. da ref. 32).

Em um estudo recente, a levedura *S. cerevisiae* foi utilizada em reações de bio-hidrogenação de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados derivados de

chalconas, em sistema bifásico. Na **Figura 7** observa-se que a reação de bio-hidrogenação da (2*E*)-3-difenil-2-propen-1-ona (**15**) mediada pelas leveduras de *S. cerevisiae* FP, CAT-1 e PE-2 em sistema bifásico, foi quimiosseletiva, formando apenas a correspondente cetona saturada denominada de deidrochalcona (**16**). Este estudo mostrou que após a otimização das condições experimentais o produto **16** foi obtido com altas conversões (>99%).<sup>15</sup>



**Figura 7-** Bio-hidrogenação da chalcona **15** catalisada por **FP**. (adaptado da ref. 15)

Agentes redutores tradicionais como  $\text{LiAlH}_4$  e  $\text{NaBH}_4$  são também utilizados em sínteses de laboratório, sendo que o borohidreto de sódio apresenta maior seletividade em condições controladas de reação.<sup>35,36</sup>

Como mencionado nos exemplos anteriores, e em virtude do crescente interesse da química ecologicamente correta, agentes redutores biológicos vem sendo cada vez mais utilizados para diminuir os impactos causados pelos catalisadores químicos tradicionais, tais como,  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{H}_2\text{-Pd/C}$ .<sup>7,10,29,32</sup>

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Preparar e caracterizar compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$  - insaturados derivados de benzaldeídos e acetona; e utilizar estes substratos em reações de bio-hidrogenação mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em sistema bifásico.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar, por técnicas espectroscópicas de infra-vermelho (IV) e ressonância magnética de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ) e ponto de fusão, os compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados derivados de benzaldeídos substituídos e acetona;
- Preparar, purificar e caracterizar por técnicas espectroscópicas (IV, RMN- $^1\text{H}$ ) os correspondentes álcoois obtidos através da reação com  $\text{NaBH}_4$  para serem utilizados como padrões nas análises de RMN- $^1\text{H}$  e cromatografia gasosa (CG);
- Utilizar os derivados de dibenzalacetona nas reações de bio-hidrogenação mediada pela levedura *S. cerevisiae* (fermento de pão, **FP**) em sistema bifásico formado por *n*-hexano:tampão fosfato de potássio dibásico/ácido cítrico (pH 5,5);
- Estudar a influência da massa de **FP**, temperatura, pH e agitação na bio-hidrogenação da dibenzalacetona;
- Caracterizar pela técnica espectroscópica de RMN $^1\text{H}$ , os produtos obtidos nas reações de bio-hidrogenação;
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura;
- Divulgar os resultados obtidos em congressos específicos da área. (SBQ-Sul, em ANEXO)

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reagentes, solventes e biocatalisador:

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Aldrich: *p*-metoxibenzaldeído (98%), *p*-nitrobenzaldeído (98%), piperonal (99%) e *p*-ciano-benzaldeído (95%)
- ✓ Vetec: benzaldeído, diclorometano, silica gel-60, e fosfato de potássio dibásico anidro (98%)
- ✓ Grupo Química: etanol absoluto, acetona e acetato de etila
- ✓ Nuclear: sulfato de magnésio anidro
- ✓ Quimex: etanol e hidróxido de sódio
- ✓ F. Maia: *n*-hexano
- ✓ CRQ: Ácido cítrico anidro (99,5%)
- ✓ Cambridge Isotope Laboratories (CIL): clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) (99,8%) e acetona deuterada (99%)
- ✓ Fermento de Pão (**FP**) comercial da *Fleischmann*.

### 4.2. Técnicas de caracterização

Para avaliar as conversões em produto nas reações de bio-hidrogenação das dibenzalacetonas substituídas, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (CG) GC-14B Shimadzu com coluna capilar de fase estacionária quiral da CHROMPACK e/ou de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H).

As análises de infravermelho (IV) foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16PC em pastilha KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H), foram obtidos em espectrômetro Varian (400MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS,  $\delta=0,00$ ) e clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) ou acetona deuterada como solventes.

As medidas do ponto de fusão foram realizadas no equipamento da Micro Química APF-301. As reações de bio-hidrogenação foram realizadas em banhos termostatizados da Micro Química-MOBTZ99-20 ou da Tecnal TE-053.

As condições adotadas para realizar as análises de CG e CG-EM estão demonstradas na **Tabela 2**. A conversão em produto foi calculada através da razão das áreas dos picos referentes ao reagente e aos produtos.

**Tabela 2-** Condições de programação do CG-quiral e CG-EM

<b>Parâmetros</b>	
<b>Coluna</b>	CP 7502 Chirasil - DEX CB J & W Cientific' DB-5-M30
<b>Temperatura inicial</b>	100 °C
<b>Temperatura final</b>	230 °C
<b>Taxa de aquecimento</b>	20 °C/min
<b>Tempo final</b>	40 min
<b>Injetor: Split 200</b>	250
<b>Detector: FID</b>	275
<b>Pressão do gás carreador (H<sub>2</sub>)</b>	75 kPa
<b>Volume da amostra</b>	1 µL

#### 4.3. Procedimento geral para preparação das dibenzalacetonas (17-21)

Os substratos **17-21** foram sintetizados por condensação aldólica entre a acetona e os benzaldeídos substituídos, na presença de hidróxido de sódio, como catalisador. Este procedimento está baseado em trabalhos clássicos citados na literatura com adaptações.<sup>37</sup>

Para o preparo dos substratos, em um balão de fundo redondo munido de agitação magnética, adicionou-se 2 g do benzaldeído substituído solubilizado em etanol e acetona em excesso (5x). Com auxílio de pipeta Pasteur adicionou-se lentamente 10 gotas de solução NaOH 1 molL<sup>-1</sup>.

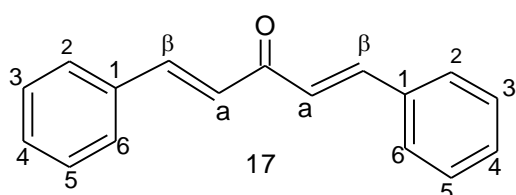
A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada utilizando como eluente *n*-hexano:acetato de etila (9:1, v/v), ou outra mistura de solventes adequada para a eluição. O produto foi armazenado sob refrigeração por ~24h para total precipitação, e posteriormente filtrado em um funil de Büchner e lavado com etanol a frio. A recristalização dos compostos foi realizada com etanol absoluto. Os produtos da reação foram pesados e então calculou-se o rendimento. A



caracterização dos produtos foi efetuada pelo ponto de fusão, e por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e de ressonância magnética de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ).

A seguir serão apresentados os dados analíticos e espectroscópicos para os compostos **17-21**.

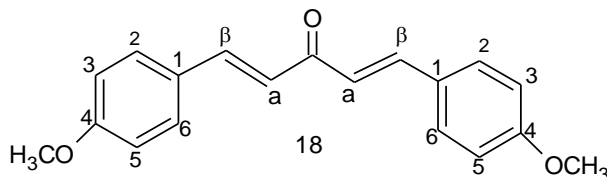
➤ **(1E-4E)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (17)**



$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$   
MM: 234,3  $\text{g mol}^{-1}$

- **Tempo reacional:** 6 h.;
- Sólido amarelo canário;
- 0,98 g (50% de rendimento);
- **pf.:** 109 °C (lit 112 °C);
- **R<sub>f</sub>:** 0,45 (*n*-hexano:acet. etila, 9:1 v/v);
- **IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr):** 3022, 1648, 1591, 1339, 1190, 992, 757, 693;
- **RMN- $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm):** 7,10 (d,  $J=16\text{Hz}$ , 2H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,41 (m, 6H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_5$ ), 7,62 (dd, 4H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ), 7,74 (d,  $J=16\text{Hz}$ , 2H e  $\text{H}_\beta$ ).

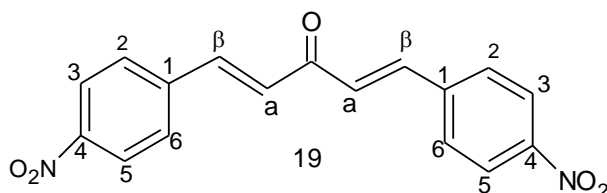
➤ **(1E-4E)-1,5-di-*p*-metóxfenil-1,4-pentadieno-3-ona (18)**



$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$   
MM: 294,2  $\text{g mol}^{-1}$

- **Tempo reacional:** 3 h.
- Sólido amarelo claro;
- 1,46 g (37 % de rendimento);
- **pf.:** 123 °C (lit 122-123 °C<sup>38</sup>);
- **R<sub>f</sub>:** 0,45 (*n*-hexano:acet. etila, 7:3 v/v);
- **IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr):** 3036, 1653, 1599, 1176, 1029, 830,540;
- **RMN- $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm):** 3,85 (s, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6,97 (m, 6H,  $\text{H}_\alpha$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ), 7,56 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 4H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ), 7,72 (d,  $J=16\text{Hz}$ , 2H,  $\text{H}_\beta$ ).

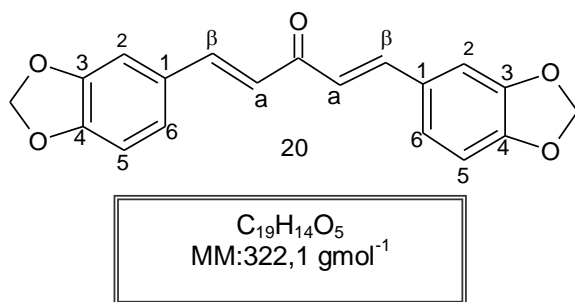
➤ **(1E,4E)-1,5-di-*p*-nitrofenil-1,4-pentadieno-3-ona (19)**



$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$   
MM: 324,1  $\text{g mol}^{-1}$

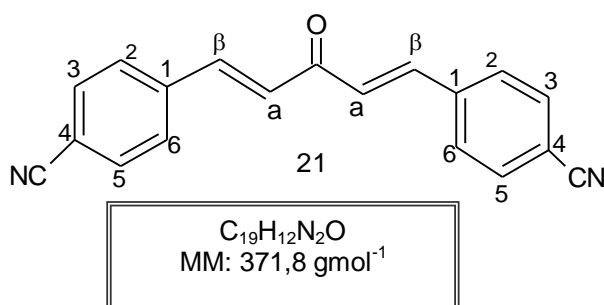
- **Tempo reacional:** 6 h.
- Sólido amarelo escuro;
- 1,31g (61 % de rendimento);
- **pf.:** 246 °C (lit 245 °C<sup>39</sup>);
- **R<sub>f</sub>:** 0,46 (*n*-hexano:acet. etila, 7:3 v/v);
- **IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ (KBr):** 3108, 1606, 1534, 1340, 1190, 852, 703;
- **RMN- $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm):** 7,27 (d,  $J=16\text{Hz}$ , 2H,  $\text{H}_\alpha$ ), 7,84 (m, 6H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_\beta$ ), 8,30 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 4H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ).

➤ **(1E,4E)-1,5-(1,3-dibenzodioxol-5-il)fenil-1,4-pentadieno-3-ona (20)**



- **Tempo reacional:** 1 h.
- Sólido marrom claro
- 0,38 g (18% de rendimento);
- **pf.:** 237 °C (189-200 °C<sup>40</sup>);
- **R<sub>f</sub>:** 0,48 (*n*-hexano:acet. etila, 7:3 v/v);
- **IV  $\nu_{max}/cm^{-1}$ (KBr):** 3015, 1670, 1623, 1038, 1501, 1446, 1248, 929, 806, 540.

➤ **(1E,4E)-1,5-*p*-cianodifenil-1,4-pentadieno-3-ona (21)**



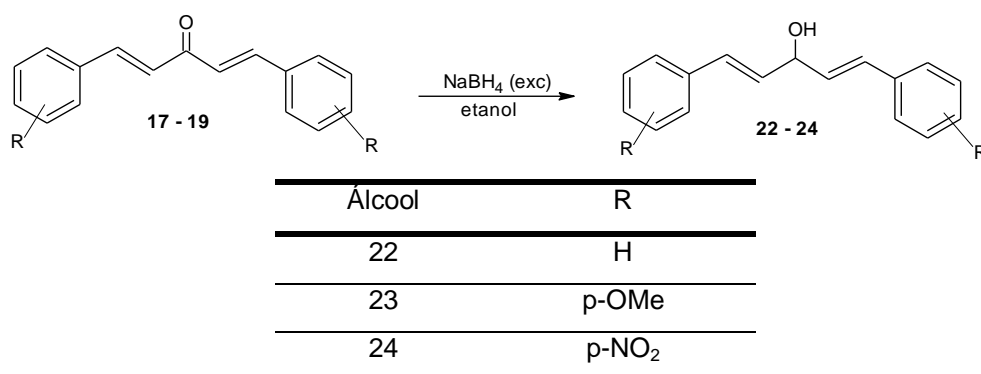
- **Tempo reacional:** 1:30 h.
- Sólido amarelo;
- 1,19 g (74% de rendimento);
- **pf.:** 229 °C (não consta °C lit.);
- **R<sub>f</sub>:** 0,43 (*n*-hexano:acet. etila, 7:3 v/v);
- **IV  $\nu_{max}/cm^{-1}$ (KBr):** 3038, 2227, 1668, 1606, 1414, 1018, 837, 564.

#### 4.4. Procedimento geral para redução dos compostos 17-19 *via* química

Os álcoois obtidos através da redução dos substratos **17-19** usando borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), foram utilizados como padrões nas análises de RMN-<sup>1</sup>H e cromatografia gasosa (CG). Os compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$  - insaturados **17-19** foram reduzidos de acordo com a metodologia descrita a seguir e que foi adaptada das referências 35-37.

A temperatura ambiente foram adicionados em um balão de fundo redondo, ~1,6 mmol dos substratos **17-19** dissolvidos em aproximadamente 20 mL de etanol, e em seguida 7,9 mmol de NaBH<sub>4</sub> misturado com 1 g de sílica gel. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada utilizando eluente *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v).

Após o término, a mistura reacional foi filtrada e lavada com pequenas porções de diclorometano (2x20 mL), e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Os produtos obtidos (**22-24**) foram caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H e CG-quiral. (**Figura 8**)

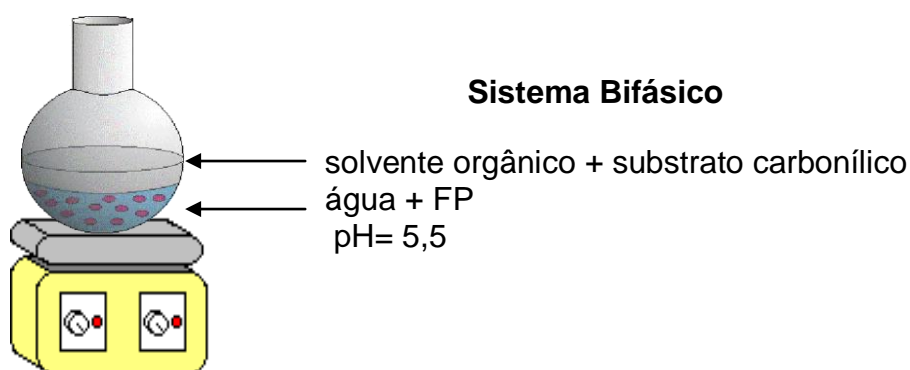


**Figura 8-** Redução dos substratos 17–19 via química.

As análises espectroscópicas dos álcoois 22-24 serão apresentados nos resultados e discussões. (item 5.2)

#### 4.5. Procedimento geral de bio-hidrogenação da (1*E*-4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (17)

Para a reação de bio-hidrogenação de 17, foram colocados em um erlenmeyer de 125 mL, 0,5 mmol do substrato dissolvido em 30 mL de (*n*-hexano), 30 mL de tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ácido cítrico (0,2M/0,1M), em pH 5,5 e 4 g de FP. Estes frascos foram submetidos à agitação magnética com temperatura controlada. (Figura 9)



**Figura 9-** Sistema bifásico usado nas reações de bio-hidrogenação.

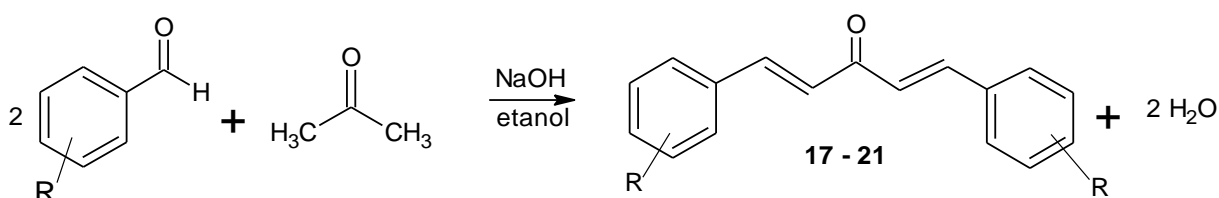
As alíquotas foram retiradas da reação em tempos pré-determinados e extraídas com diclorometano (3x15 mL). Os produtos formados foram submetidos às análises de RMN-<sup>1</sup>H e CG-quiral.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, realizou-se a biotransformação de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados derivados de benzaldeídos substituídos e acetona, mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (**FP**). Primeiramente, serão apresentados e discutidos os resultados relacionados a síntese e caracterização destes compostos (**17-21**) e da redução com  $\text{NaBH}_4$  para a obtenção dos álcoois correspondentes (**22-24**) que serão utilizados como padrões nas análises de CG e RMN- $^1\text{H}$ . Após serão abordadas as reações de bio-hidrogenação desses substratos utilizando como biocatalisador a levedura *S. cerevisiae* em sistema bifásico. Foi avaliada a influência da massa de **FP**, massa do substrato, tempo de reação, temperatura e pH da fase aquosa.

### 5.1. Preparação das dibenzalacetonas (**17-21**)

Os compostos **17-21** foram sintetizados com adaptação do procedimento descrito na literatura a partir de benzaldeídos e da acetona, utilizando NaOH como catalisador e etanol como solvente, a temperatura ambiente (**Figura 10**).<sup>37</sup>

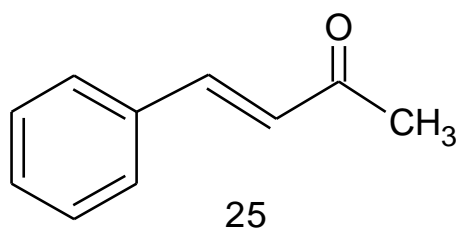


Compostos	R
17	H
18	p-OMe
19	p-NO <sub>2</sub>
20	3,4(-O-CH <sub>2</sub> -O-)
21	p-CN

**Figura 10-** Síntese dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados (**17-21**)

Nesta reação pode ocorrer a formação de mais de um produto. Por exemplo, na reação do benzaldeído com acetona em meio básico, inicialmente forma a benzalacetona (**25**).

Porém, após desprotonação de um hidrogênio do grupo metila de **25** é formado um novo carbânion que reage com outra molécula de benzaldeído formando a dibenzalacetona (**17**).



Portanto a formação de mais de um produto justifica o baixo rendimento obtido dos produtos **18** e **20**. Observou-se também que o tempo de reação influencia no produto obtido, sendo que um maior tempo favorece a formação nas dibenzalacetonas.

Os compostos foram analisados por técnicas espectroscópicas de RMN-<sup>1</sup>H e IV, e determinação do ponto de fusão. Os dados analíticos de rendimento, ponto de fusão e R<sub>f</sub>, estão listados na **Tabela 3**.

**Tabela 3-** Dados analíticos dos compostos **17-21**.

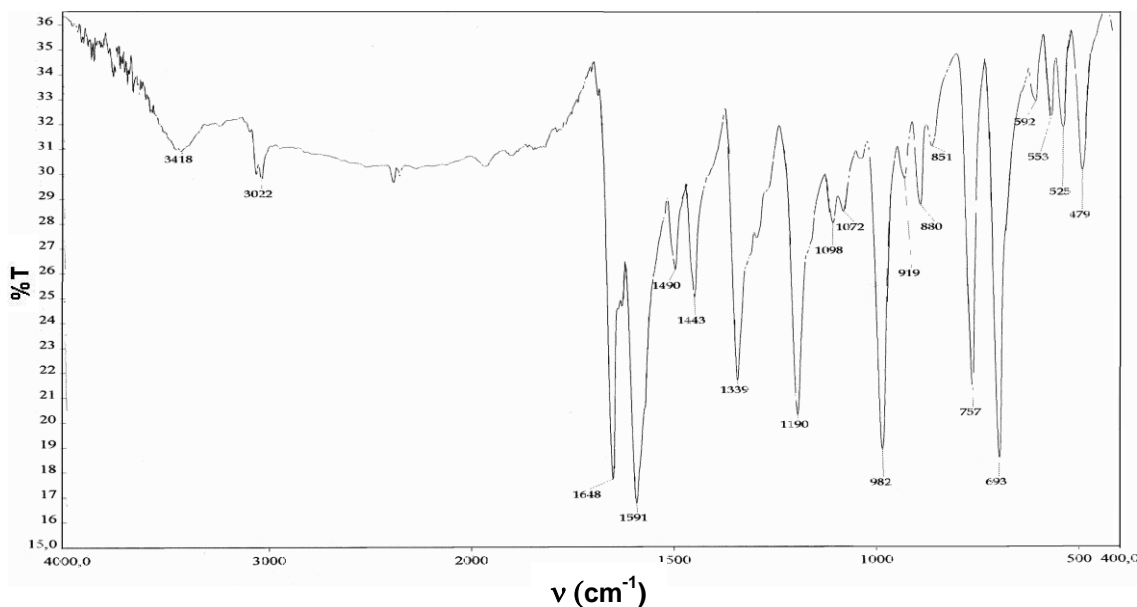
Compostos	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	R <sub>f</sub>	pf (°C) (pf lit)
<b>17</b>	6	50	0,47 <sup>a</sup>	109 (112) <sup>37</sup>
<b>18</b>	3	37	0,45 <sup>b</sup>	123 (122-123) <sup>38</sup>
<b>19</b>	6	61	0,46 <sup>b</sup>	245 (245) <sup>39</sup>
<b>20</b>	1	18	0,48 <sup>b</sup>	237 (189-201) <sup>40</sup>
<b>21</b>	1:50	74	0,43 <sup>b</sup>	229 ( * )

(a) *n*-hexano:acet. etila 9:1 (v/v) (b) *n*-hexano:acet. etila, 7:3 (v/v) ; \* pf não encontrado na literatura.

As dibenzalacetonas foram obtidas na forma sólida de coloração amarela, com rendimentos de 18-74%. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente são compatíveis com os citados na literatura, com exceção do composto **20**. Após a recristalização, as análises de CCD realizadas durante a preparação dos produtos **17-21** apresentaram uma única mancha indicando assim sua pureza.

A dibenzalacetona **17** foi selecionada para uma análise mais detalhada de seus espectros de IV, CG-quiral e RMN-<sup>1</sup>H, sendo apresentados nas **Figuras 11, 12 e 13**, respectivamente.

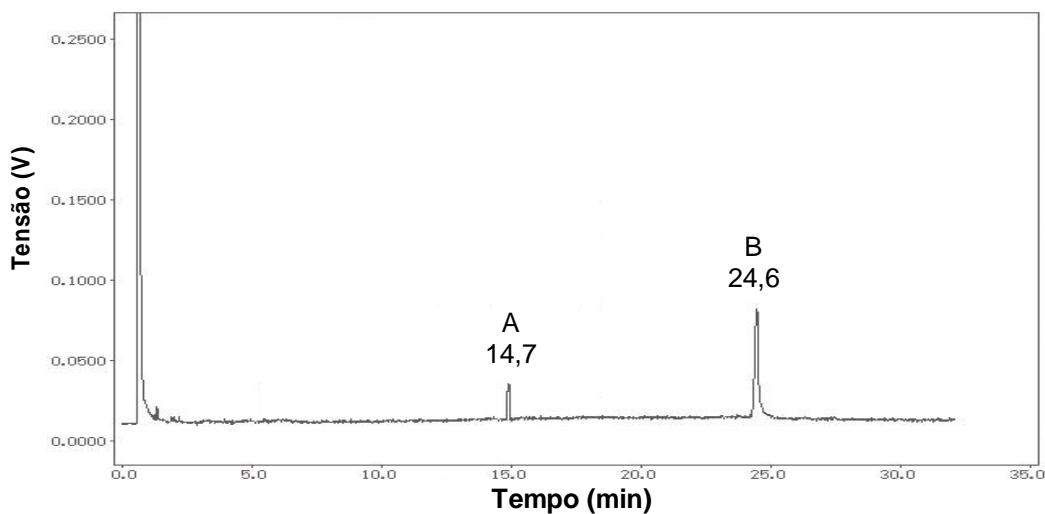
A **Figura 11**, apresenta o espectro de infravermelho da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona(**17**).



**Figura 11-** Espectro de infravermelho de **17**. [pastilha de KBr]

No espectro de IV são observadas bandas na região de 3022 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação C-H dos anéis aromáticos. Em 1648 e 1591 cm<sup>-1</sup> observam-se as bandas de estiramento referentes as ligações C=O e C=C de compostos carbonílicos α,β-insaturados, respectivamente. Em 757 a 693 cm<sup>-1</sup> são observadas bandas características das vibrações de deformação angular fora do plano das ligações carbono hidrogênio do anel aromático.<sup>41</sup>

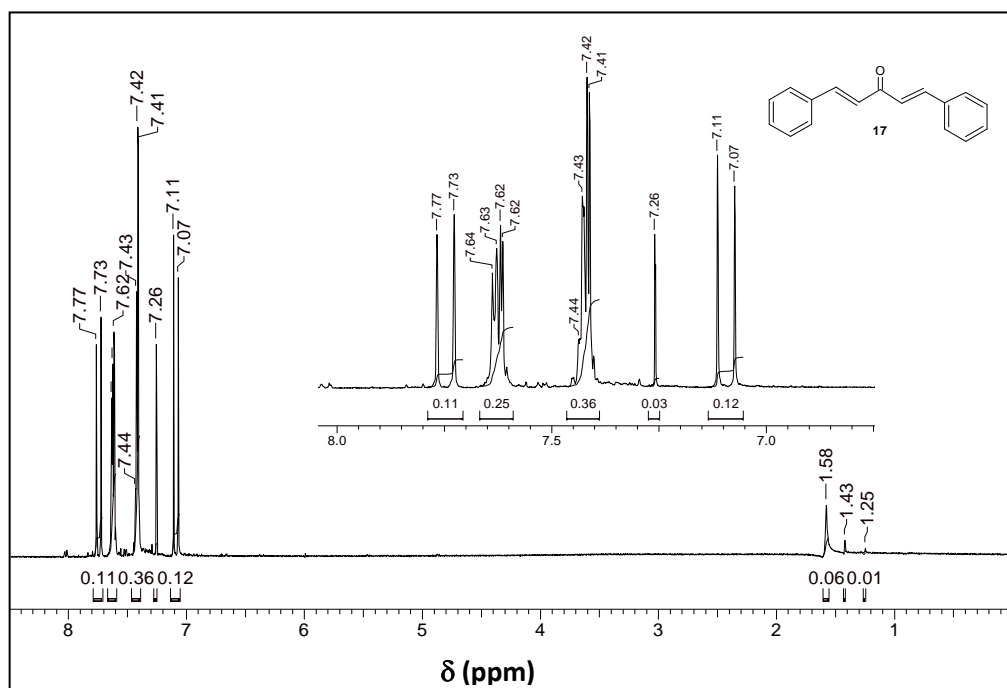
A **Figura 12**, mostra o cromatograma da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (17).



**Figura 12-** Cromatograma de CG-quiral do composto 17. [condições operacionais: inj.=250°C, Det.=275°C, Ti =100°C, Tf = 230°C, Δaq.1 =20°C/min, pH2 = 75kP]

Pela análise de CG-quiral, observam-se a presença de dois picos, um em maior proporção com o  $t_R$  de 24,6 min (94%) e outro em menor proporção com  $t_R$  de 14,7 min (6%). O pico de maior área (**B**) refere-se ao composto 17, e o de menor área refere-se a alguma impureza e/ou subproduto da reação.

A **Figura 13**, apresenta o espectro de RMN- $^1\text{H}$  deste composto em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 13-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da (1*E*,4*E*)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona. [ $\text{CDCl}_3$ , 400MHz]

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H pode-se observar um dublete centrado em 7,09 ppm ( $J=16$  Hz) referente aos 2 hidrogênios  $\alpha$ , um dublete centrado em 7,75 ppm ( $J=16$  Hz) referente aos 2 hidrogênios  $\beta$ . Os sinais na região de 7,42 e 7,62 ppm referem-se aos hidrogênios dos anéis aromáticos.

Para os compostos **18-21** os espectros de IV apresentam bandas em  $\sim 1668$  e  $\sim 1590$   $\text{cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento das ligações C=O e C=C, respectivamente. No espectro IV de **21**, além da presença das bandas já citadas, observam-se bandas de C=O ( $\sim 1711 \text{cm}^{-1}$ ) provenientes do benzaldeído de partida, mostrando que há uma mistura do reagente e do produto obtido, a dibenzalacetona.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e IV dos compostos **18-21** estão apresentados no ANEXO.

## 5.2. Redução dos compostos 17-21 via *química* com NaBH<sub>4</sub>

Os álcoois obtidos através da redução dos substratos **17-21** usando borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), foram utilizados como padrões nas análises de RMN-<sup>1</sup>H e CG-quiral.

Na **Tabela 4** estão apresentados os dados analíticos de rendimento, R<sub>f</sub> e o tempo de reação.

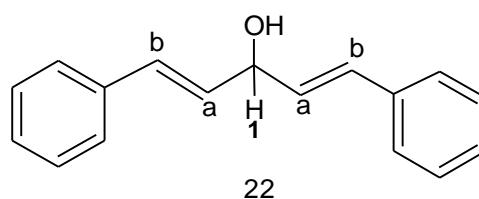
**Tabela 4-** Dados analíticos para os álcoois **22-24**

Álcool	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	R <sub>f</sub>
<b>22</b>	0,5	84	0,29 <sup>a</sup>
<b>23</b>	3	65	0,34 <sup>b</sup>
<b>24</b>	6	80	0,37 <sup>b</sup>

(a) *n*-hexano:acet. etila, 9:1 (v:v); (b) *n*-hexano:acet. etila, 7:3 (v:v);

Os álcoois foram obtidos com bons rendimentos, sendo de 65 a 84%, e na forma sólida com coloração branca. Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H em geral, apresentaram sinais característicos da formação dos álcoois, tais como um dublete em  $\sim 5,30$  ppm, um duplo dublete em  $\sim 6,30$  ppm e um dublete em  $\sim 6,60$  ppm, referente aos hidrogênios H<sub>1</sub>, H $\alpha$  e H $\beta$ , respectivamente.



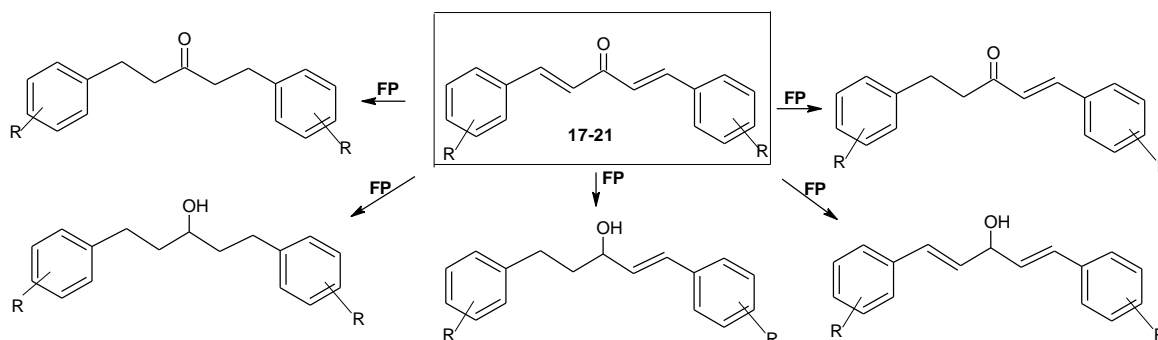


Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H dos álcoois **22-24** estão apresentados no ANEXO. É importante ressaltar que não foram obtidos os álcoois provenientes dos compostos **20** e **21**, nas condições experimentais utilizadas.

### 5.3. Reações de bio-hidrogenação das dibenzalacetonas 17-21 utilizando FP

A reação de redução dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$  - insaturados, na presença de **FP**, podem resultar na redução completa do sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado com a formação do álcool saturado, redução específica da carbonila levando ao álcool alílico correspondente ou hidrogenação exclusiva da ligação C=C com formação do aldeído ou cetona saturado.<sup>27</sup>

Na **Figura 14**, são apresentados os possíveis produtos obtidos na biotransformação dos compostos **17-21**.

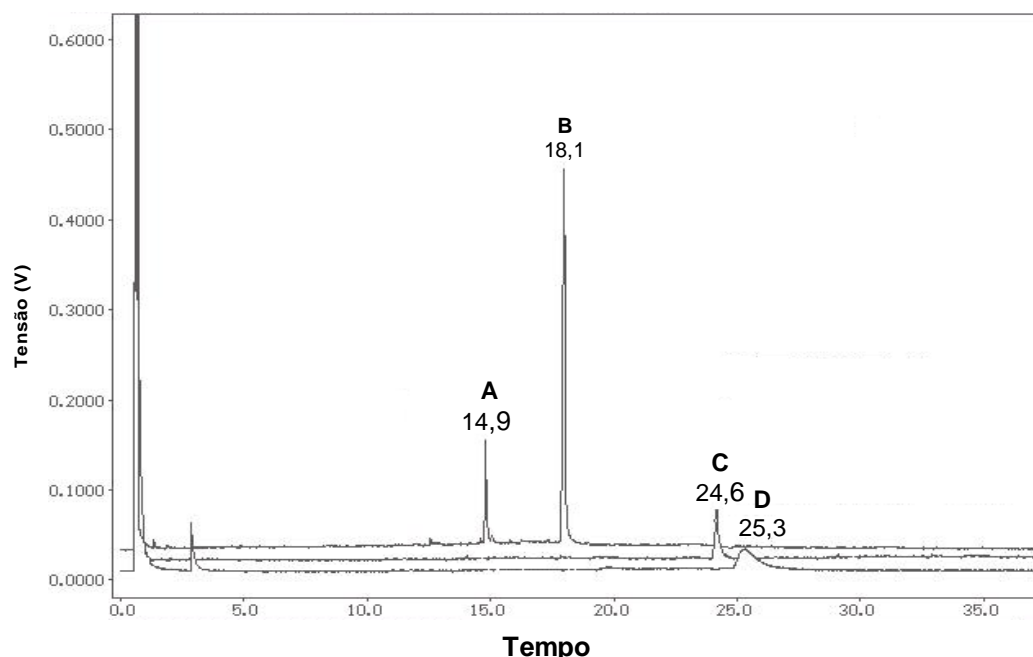


Compostos	R
17	H
18	p-OMe
19	p-NO <sub>2</sub>
20	3,4-(-O-CH <sub>2</sub> -O-)
21	p-CN

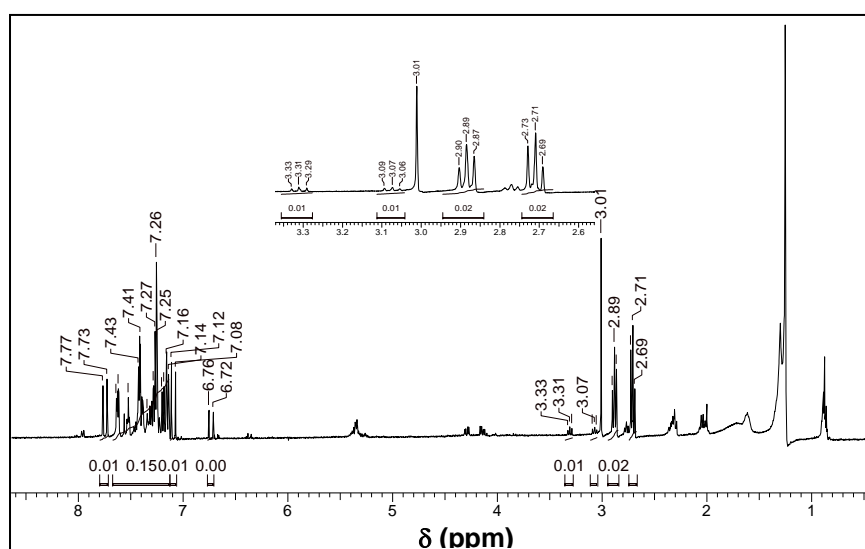
**Figura 14-** Possibilidades de formação dos produtos nas reações de bio-hidrogenação dos compostos **17-21**, mediadas por **FP**

Para verificar qual foi o produto formado na bio-hidrogenação das dibenzalacetonas mediada por **FP** comercial, foram retiradas alíquotas periodicamente da reação, e a formação dos produtos analisada por CG-quiral, CG-MS e RMN- $^1\text{H}$ .

A **Figura 15** mostra o cromatograma de CG-quiral e a **Figura 16** o espectro de RMN- $^1\text{H}$  de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de **17** mediada por *S. cerevisiae*.



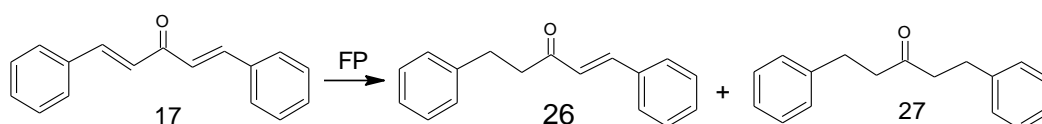
**Figura 15-** Sobreposição dos cromatogramas do composto **17** (pico **C**); bio-hidrogenado com **FP** (pico **A** e **B**) e seu álcool **22** (pico **D**). [Parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 2]



**Figura 16-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de uma alíquota da reação de bio-hidrogenação de **17** mediada por **FP** em sistema bifásico, em 24h. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]

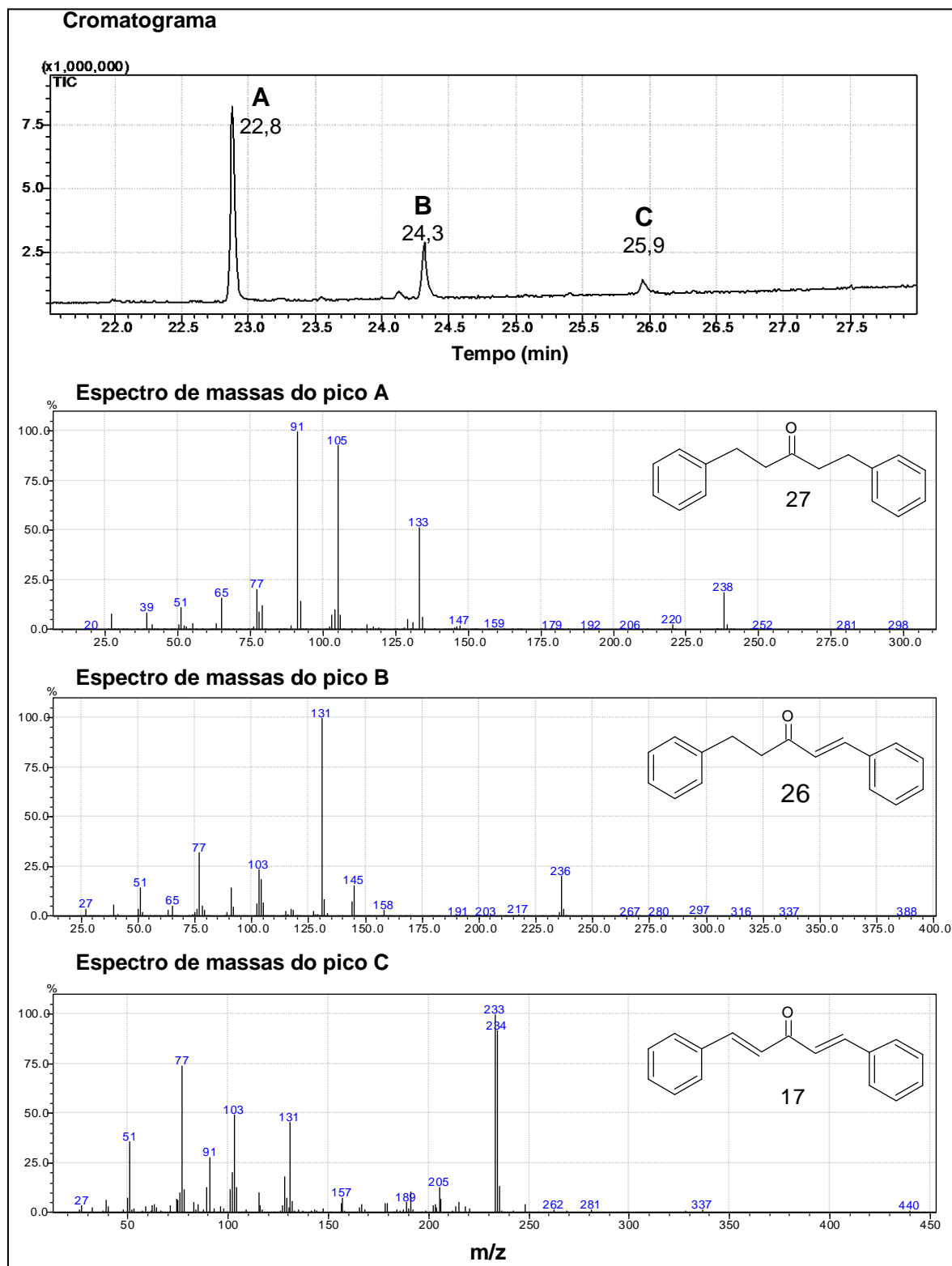
Observa-se pela sobreposição dos cromatogramas da dibenzaldeacetona **17** (pico **C**), do seu respectivo álcool **22** (pico **D**) e dos produtos da reação biocatalisada (picos **A** e **B**) que foram obtidos dois compostos com  $t_R$  de 14,9 (30%) e 18,1 min (69%), e que não correspondem ao álcool formado *via* química.

Pela análise do espectro de RMN- $^1\text{H}$  desta mesma alíquota, observam-se quatro tripletes centrados em 2,71, 2,89, 3,07 e 3,31 ppm, um dublete em 6,74 ppm ( $J = 16,0$  Hz), um dublete em 7,10 ppm ( $J = 16,0$  Hz), um multiplete em 7,12 a 7,63 ppm, e um dublete em 7,74 ppm ( $J = 16,0$  Hz). Esses resultados indicam a formação de dois produtos (**26** e **27**), sendo estes os de hidrogenação das ligações duplas C=C, devido ao aparecimento dos quatro tripletes que são característicos destes compostos.



**Figura 17-** Produtos obtidos na reação de bio-hidrogenação de **17** medida por **FP**

Para comprovar esses resultados, realizou-se a análise de CG-EM. Pela análise do espectro de massas do pico **A**, observa-se a presença do íon molecular em  $m/z$  238 e os principais fragmentos em 133, 105, 91 e 77. O espectro de massas do pico **B** apresenta o íon molecular em  $m/z$  236 e os sinais em 131, 103, 91 e 77 como fragmentos principais. (**Figura 18**)



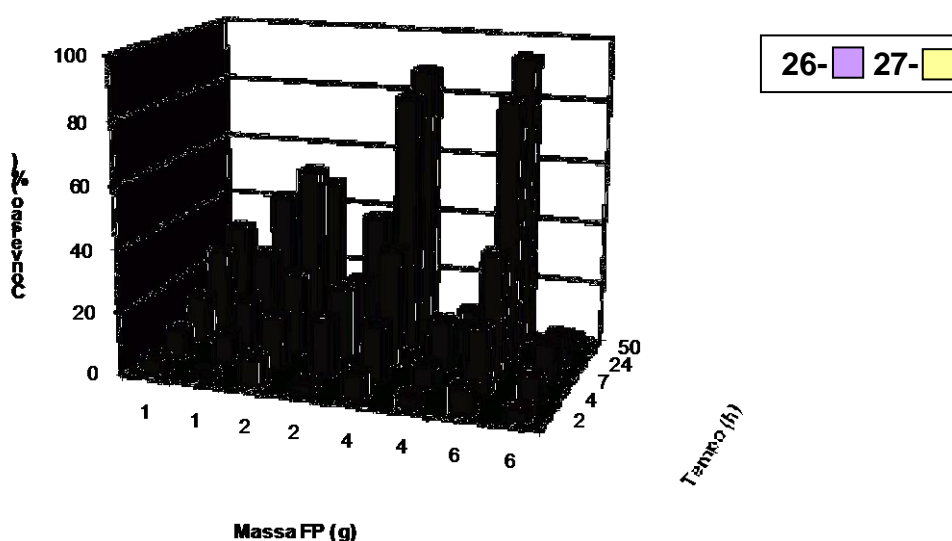
**Figura 18-** Cromatogramas e espectros de massa de uma alíquota da reação de **17** mediada por **FP** em sistema bifásico, 35 °C, 24 h. [Parâmetros operacionais: conforme descrito na Tabela 2]

Estes resultados aliados aos obtidos por RMN-<sup>1</sup>H indicam que os produtos formados na biotransformação de **17** mediada por **FP** são as cetonas (1E)-1,5-difenil-1-penten-3-ona (**26**) e 1,5-difenil-3-pentanona (**27**).

A partir da confirmação da estrutura do produto formado na reação de bio-hidrogenação de **17** mediada por **FP**, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos desta reação, sob diferentes condições reacionais, e a seguir os resultados preliminares obtidos na biotransformação das dibenzalacetonas **18-21**.

### 5.3.1. Influência da massa de **FP** e do tempo reacional da biotransformação de **17**.

Primeiramente realizou-se o estudo da influência da massa de **FP** (2-6 g) e do tempo reacional, na biotransformação de **17** (1mmol) em sistema bifásico (pH 5,5), a 35°C. A escolha dos valores de pH 5,5 e t = 35 °C nesta etapa foi baseada em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa na bio-hidrogenação de chalconas.<sup>15</sup> Os resultados estão apresentados na **Figura 19**.



**Figura 19-** Influência da massa de **FP** e o tempo reacional na bio-hidrogenação de **17**. [1 mmol de substrato, 30 mL de n-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/ $K_2HPO_4$  (0,1M, 0,2M), pH 5,5; 35 °C]

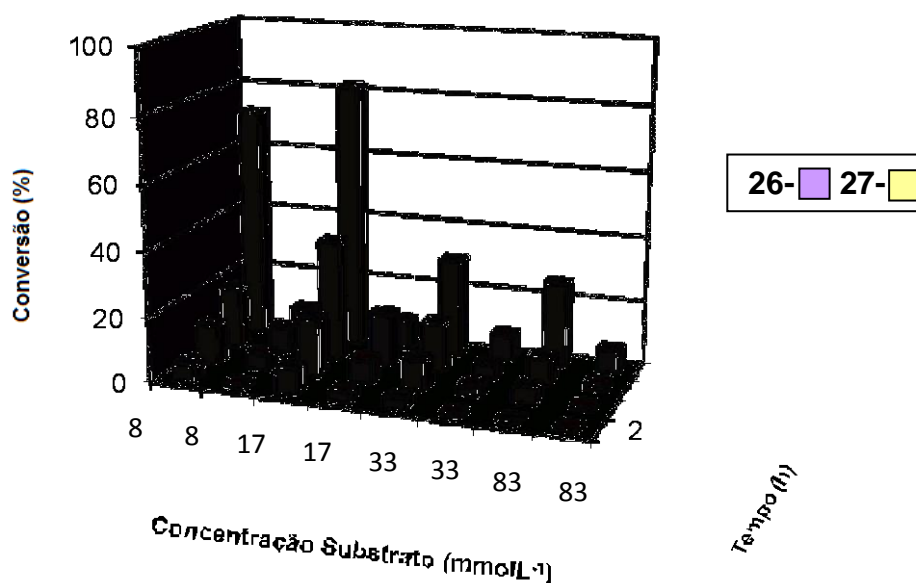
Observa-se na **Figura 19** que com o aumento da massa do biocatalisador e do tempo reacional, o produto **27** foi obtido majoritariamente. As maiores conversões em **27** foram obtidas quando utilizou-se 4 e 6 g de **FP**, no tempo de reação de 24 e 50 h (82-94%). Quando a reação foi realizada com 1 g de **FP** as conversões em **26** e **27** foram praticamente as mesmas nas primeiras horas de reação.

A partir destes resultados, os estudos seguintes foram realizados em 24 h e com 4 g de **FP**, pois ao utilizar 6 g de **FP** e em tempos maiores de reação, as conversões aos produtos mantiveram-se constantes.

### 5.3.2. Influência da concentração do substrato

Para avaliar o efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de **17** catalisada pela levedura *S. cerevisiae*, foram realizados experimentos variando a concentrações do substrato de 8 a 83 mmolL<sup>-1</sup> em sistema bifásico (pH 5,5), a 35 °C por 24 h.

As conversões em produtos em função da concentração do substrato e do tempo reacional estão apresentadas na **Figura 20**.



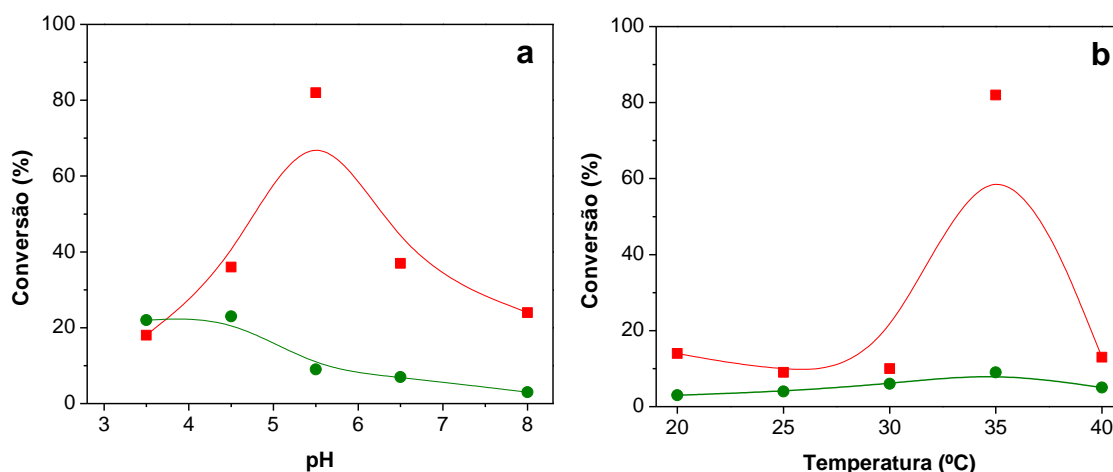
**Figura 20-** Efeito da concentração do substrato na reação de bio-hidrogenação de **17** catalisada por **FP** em sistema bifásico. [condições reacionais: 4g biocatalisador, 30mL de *n*-hexano, 30mL de solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ácido cítrico (0,2 M/0,1 M pH 5,5), agitação magnética, á 35°C)

Observa-se que as maiores conversões em **27** foram obtidas quando a reação foi realizada com 8 e 17 mmolL<sup>-1</sup> do substrato, após 24 h, sendo de 72 e 82%, respectivamente. Com o aumento da concentração do substrato há um decréscimo nas conversões, indicando que provavelmente ocorreu a inibição da atividade das enzimas presente no **FP** pelo substrato.<sup>29</sup> Portanto a concentração de 17 mmolL<sup>-1</sup> foi utilizada nos experimentos posteriores.

### 5.3.3. Influência da temperatura e pH

Fatores como temperatura e pH são capazes de alterar a atividade das enzimas e, conseqüentemente, a velocidade das reações por elas catalisadas. Nesse sentido, cada enzima possui um pH e temperatura ótima, onde sua atividade é máxima.<sup>10</sup>

Para verificar a influência do pH e da temperatura na reação de bio-hidrogenação de **17** mediada por **FP** em sistema bifásico, variou-se o pH da solução tampão de 3,5 a 8 e a temperatura de 20 a 40 °C. Os resultados obtidos estão apresentados das **Figuras 21a-b**.



**Figura 21a-b-** Influência do pH (a) e da temperatura (b) na reação de bio-hidrogenação de **17**, produto **26** (●) e produto **27** (■) [4 g de **FP**, 17 mmolL<sup>-1</sup> de **17**, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M), 24 h].

Pode-se verificar na Figura **21a**, a dependência da conversão em relação ao pH da solução tampão do sistema bifásico. Com o aumento do pH de 3,5 a 5,5, as conversões em **27** aumentaram de 18 a 82%. Acima do pH 5,5 houve uma diminuição nas conversões, sendo de 82 a 24%. Portanto pode-se afirmar que o pH ótimo da reação de bio-hidrogenação de **17** mediada por **FP** é 5,5.

A partir desses resultados e para os estudos subsequentes utilizou-se o pH 5,5.

A **Figura 21b** mostra o intervalo de temperatura estudada na reação de bio-hidrogenação de **17** em sistema bifásico. A maior conversão em **27** foi obtida a 35 °C, sendo de 82%. Acima de 35 °C, as conversões diminuíram conforme esperado,

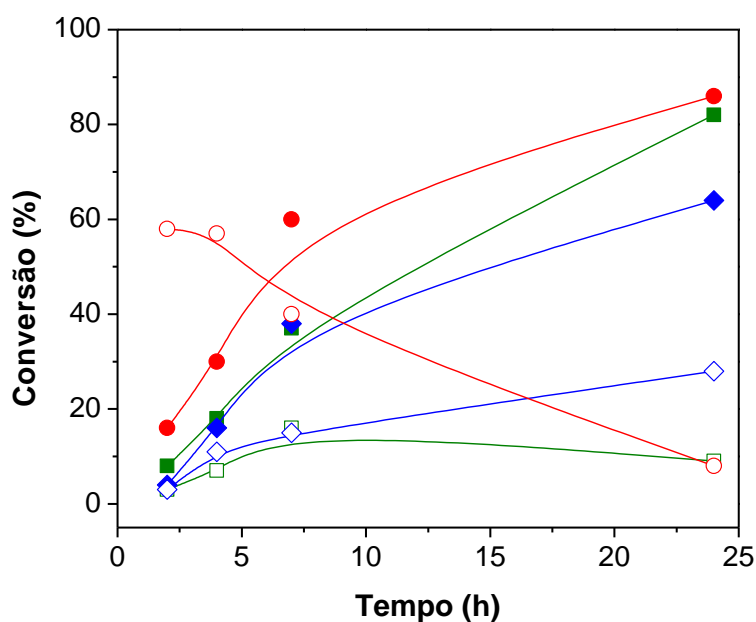
pois em temperaturas elevadas pode ocorrer a desnaturação ou diminuição da atividade catalítica das enzimas presente no **FP**.<sup>25</sup> Os estudos a seguir foram realizados a 35 °C, considerando os dados obtidos neste estudo e outros reportados na literatura.

#### 5.3.4. Influência da agitação na bio-hidrogenação de **17**

Nas biotransformações em sistema bifásico a velocidade de agitação influencia no contato da fase aquosa (enzimas), com a fase orgânica onde se encontra o substrato de interesse. Uma agitação adequada leva a formação dos produtos em menor tempo de reação, tornando a biocatálise mais eficiente. Alguns estudos reportados na literatura mostram que a agitação muito turbulenta pode-se levar a formação do “vórtex”, onde pode ocorrer a diminuição do contato entre a enzima e o substrato, consequentemente a formação de menos produtos.

Primeiramente estudou-se três tipos de agitação (paralela, orbital e magnética com auxílio da barra magnética) na biotransformação de **17**, mantendo os parâmetros pré-estabelecidos dos experimentos anteriores.

A **Figura 22** mostra os valores de conversões em **26** e **27** quando a reação de bio-hidrogenação de **17** foi realizada com diferentes tipos de agitação, no período de 24 h.



**Figura 22-** Valores de conversões em **26** ( $\square, \circ, \diamond$ ) e **27** ( $\blacksquare, \bullet, \blacklozenge$ ) em função do tempo reacional, com agitação magnética ( $\circ, \bullet$ ), paralela ( $\square, \blacksquare$ ) e orbital ( $\diamond, \blacklozenge$ )

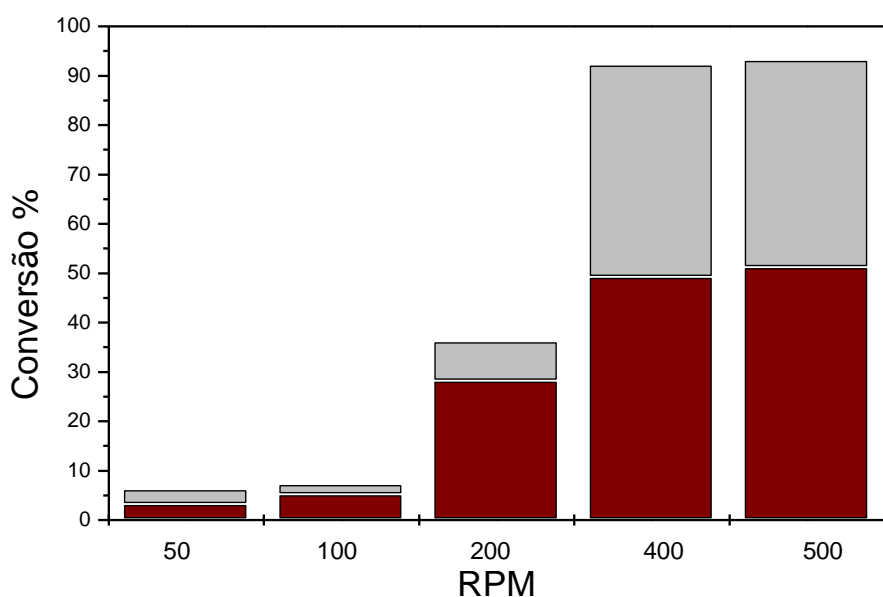


Pode-se observar na **Figura 22**, que as maiores conversões em **27** foram obtidas após 24 h de reação. Quando utilizou-se a agitação magnética e a paralela, as conversões foram de 86 e 82% respectivamente. Com agitação orbital o composto **27** foi obtido com apenas 64% de conversão neste intervalo de tempo.

Verificou-se também que as conversões em **27** são similares quando a reação de bio-hidrogenação de **17** foi realizada com agitação magnética em 4 h, e com paralela ou orbital após 7 h, sendo de 30-38%. Estes resultados mostraram que a agitação magnética foi mais eficiente nesta reação.

A partir destes resultados, realizou-se o estudo da influência da agitação magnética em diversas velocidades monitoradas por rotações por minuto (RPM).

Para verificar a influência da velocidade de agitação na conversão aos produtos **26** e **27**, foram realizados experimentos usando o agitador magnético com auxílio da barra magnética nas velocidades de 50 a 500 rpm, no período de 4 h. Os resultados estão apresentados na **Figura 23**.



**Figura 23-** Valores de conversão em 26 (■) e 27 (■) em função da velocidade de agitação (RPM). [4 g de **FP**, 17 mmolL<sup>-1</sup> do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30mL de tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M, pH 5,5, 4 h, 35 °C)]

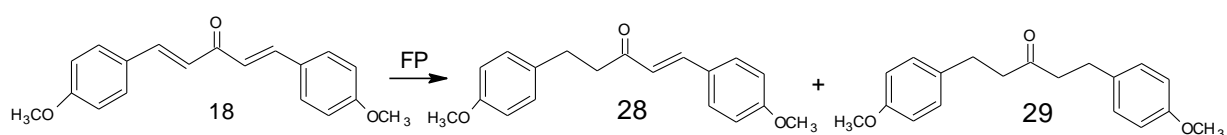
Analisando os resultados apresentados na **Figura 23**, pode-se observar que as conversões nos produtos, foram dependentes da velocidade de agitação. Com aumento da velocidade de agitação de 50 a 400 rpm, as conversões em **26** e **27**, aumentaram de 3 a 43 % e de 3 á 49% respectivamente. A partir de 400 rpm as conversões em ambos os produtos foram semelhantes ~50%.

A partir destes resultados, a velocidade de agitação de 400 rpm foi utilizada nos estudos de biotransformação das dibenzalacetonas **18-21**.

### 5.3.6. Resultados preliminares da bio-hidrogenação das dibenzalacetonas **18-21** com **FP**

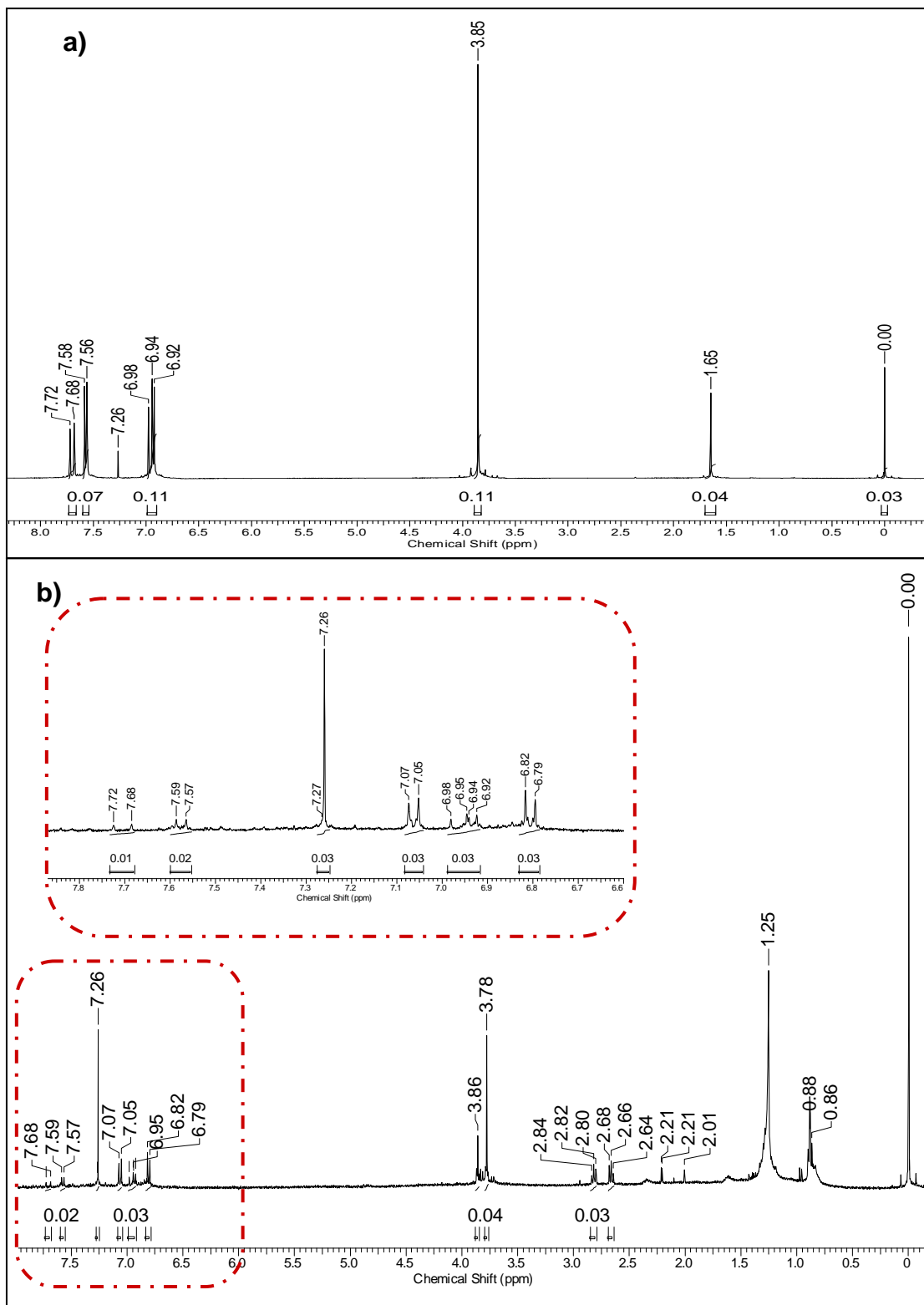
A partir das melhores condições experimentais estabelecidas na bio-hidrogenação de **17**, realizou-se a bio-hidrogenação dos substratos **18-21**, a fim de estabelecer a influência dos substituintes doadores e retiradores de elétrons dos anéis aromáticos. Entretanto quando realizou-se a biotransformação dos substratos **19-21** mediada por **FP** em sistema bifásico, não foi possível observar a formação de nenhum produto nessas condições.

Porém, quando a reação foi realizada com a dibenzalacetona **18** mediada por **FP** em sistema bifásico, foi possível observar a formação da cetona saturada **29**. (**Figura 24**) Estes resultados foram evidenciados pela análise dos espectro de RMN-<sup>1</sup>H da dibenzalacetona **18** e de uma alíquota da reação desta com **FP**.



**Figura 24-** Equação da reação de bio-hidrogenação de **18** mediada por **FP**. [4 g de **FP**, 17 mmolL<sup>-1</sup> do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30mL de tampão ácido cítrico/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 M/0,2 M), pH 5,5, 4 h, 35 °C, agitação magnética, 400 rpm]

A **Figuras 25 a e b** apresentam os espectros de RMN- $^1\text{H}$  do composto **18** e do produto da reação de bio-hidrogenação mediada por **FP**, respectivamente:



**Figuras 25a-b-** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  do substrato **18** (**a**) e de uma alíquota da reação de **18** (**b**). [4 g de **FP**,  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1 M/0,2 M), pH 5,5, 4 h, 35 °C, agitação magnética, 400 rpm]

Observa-se na **Figura 22b** a presença de dois tripletes centrado em 2,66 e 2,81 ppm, um singlete em 3,77 ppm, dois dubletes com constantes de acoplamento de 8,0 Hz centrados em 6,81 e 7,06 ppm e mais os sinais característicos da dizenzalacetona **18** (**Figura 25 a**). Esses resultados indicam a formação do produto **29**, devido a formação dos tripletes que são característicos da hidrogenação na ligação dupla carbono-carbono, e de um singlete proveniente do grupo  $-OCH_3$ . Após a bio-hidrogenação das duas ligações  $C=C$ , formou um composto com estrutura simétrica.

Portanto o tópico 5.3.6. proporciona dar continuidade a estes estudos, para melhor compreender o efeito dos substituintes presentes nas dibenzalacetonas na bio-hidrogenação mediada pela levedura *S. cerevisiae*.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados sobre a preparação e a utilização das dibenzalacetonas **17-21** como substratos nas reações de bio-hidrogenação mediadas por **FP** em diferentes condições experimentais, serão apresentadas as principais conclusões.

- As dibenzalacetonas preparadas **17-21** foram obtidas com rendimentos variando de 18 a 74%. O baixo rendimento obtido na síntese de algumas dibenzalacetonas ocorreu pelo fato da reação formar mais de um produto;
- Os álcoois **22-24** foram obtidos com bons rendimentos (65-84%);
- Na reação de bio-hidrogenação de **17** na presença do **FP** em sistema bifásico, observou-se apenas a redução da ligação C=C, mostrando a quimiosseletividade do biocatalisador;
- As melhores condições observadas na bio-hidrogenação de **17** em sistema bifásico foram:
  - ❖ **Tempo reacional e massa de FP:** As maiores conversões em **27** foram obtidas com 4 e 6 g de **FP**, após 24 e 50 h, sendo de 82 e 94% respectivamente.
  - ❖ **Concentração do Substrato:** Utilizando 8 e 17 mmolL<sup>-1</sup> do substrato após 24 h de reação as conversões em **27** foram de 72 a 82% respectivamente.
  - ❖ **Temperatura e pH:** A maior conversão em **27** foi obtida a 35 °C e pH de 5,5 após 24 h, sendo de 82%.
- A agitação magnética com auxílio da barra magn foi a mais adequada para realizar as reações, onde os produtos **26** e **27** foram obtidos com boas conversões após 7 h de reação, sendo de 40% e 60% respectivamente.
- Observou-se um aumento da conversão em **26** e **27** com o aumento da velocidade de agitação.
- Verificou-se a biotransformação das dibenzalacetonas **17** e **18** na presença de **FP** em sistema bifásico, fato que não ocorreu com o compostos **19, 20 e 21**.

Enfim, pode-se concluir que a utilização de **FP** como biocatalisador na bio-hidrogenação de **17 e 18**, é um método eficiente, pois utilizam-se de condições brandas de reação, e o biocatalisador mostrou ser quimiosseletivo perante estes compostos.

## 7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas:

- Avaliar a influência dos diferentes grupos substituintes do anel aromático das dibenzalacetonas, na bio-hidrogenação com **FP** em sistema bifásico;
- Preparar e caracterizar benzalacetonas substituídas, e utilizar na bio-hidrogenação com a levedura *S. cerevisiae*;
- Realizar a biotransformação dos compostos **17-21** mediada por leveduras imobilizadas em diversos suportes poliméricos (ex: gel de agar ou de alginato de cálcio);
- Testar outros microorganismos (ex: leveduras industriais de *S. cerevisiae*) na biotransformação de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

## 8. Referências Bibliográficas

- 1.Oliveira, L.G. ; Mantovani, S. M.; Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas, *Quim. Nova*, 32(3), **2009**, 742-756.
- 2.Rodrigues, J.A.R.; Moran, P.J.S.; Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão, *Quim. Nova*, 24(6), **2001**, 893-897.
- 3.Lima, A.W.O.; Angnes, L.; Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em química analítica, *Quim. Nova*, 22(2), **1999**, 229-245.
- 4.Lafuente, R.F.; Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation, *Enzyme Microb. Technol.*, 45, **2009**, 405-418.
- 5.Nascimento, M.G.; Zanotto, S.P.; Melegari, S.P.; Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico, *Quim. Nova*, 25(4), **2002**, 567-571.
- 6.Perles, C.F.; Moran, P.J.S.; Volpe, P.L.O.; Bioreduction of ethyl 3-oxobutyrate by *Saccharomyces cerevisiae*: A metabolic *in vivo* study, *J. Mol. Catal. B.: Enzym.*, 52-53, **2008**, 82-87.
- 7.Prado, A.G.S.; Química Verde, os desafios da química do novo milênio, *Quim. Nova*, 26(5), **2003**, 738-744.
- 8.Araque, E.; Parra, C.; Rodríguez, M.; Freer, J.; Baeza, J.; Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production, *Enzyme Microb. Technol.*, 43(2), **2008**, 120-123.
- 9.Behera, S.; Kar, S.; Mohanty, R.C.; Ray, R.C.; Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices, *Appl. Energy*, 87, **2010**, 96-100.
- 10.Borges, K.B.; Borges, W.S.; Rosa, D.P.; Pupo, M.T.; Bonato, P.S.; Collado, I.G.; Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalyst, *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, **2009**, 385-397.
- 11.McMurry, J.; *Química Orgânica*, 6ªEd., Thomson, **2005**.
- 12.Campbell, M.K.; *Biochemistry*, 2ªEd., Saunders College Publication, **1995**.
- 13.Faber, K.; *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer-Verlag: Berlim, **1997**.
14. [www.mundoeducacao.com.br/biologia/enzimas.htm](http://www.mundoeducacao.com.br/biologia/enzimas.htm), acessada em 24/10/09
15. Silva, V.D.; Stambuck, B.U.; Nascimento, M.G.; Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propene-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in water/organic solvent biphasic system; *J. Mol. Catal. B.: Enzym.*, submetido, **2009**.
- 16- Pilissão, C.; Nascimento, M.G.; Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, 2006, 428-433.
17. <http://www.rcsb.org/pdb>, acessada em 09/06/09.

- 18.Fonseca, A.M.; Monte, F.J.Q.; Oliveira, M.C.F.; Mattos, M.C.; Cordell, G.A.; Braz-Filho, R.; Lemos, T.L.G.; Coconut water (*Cocos nucifera* L.)-A new biocatalyst system for organic synthesis, *J. Mol. Catal. B.: Enzym.*, 57, **2009**, 78-82.
- 19.Pereira, R.S.; Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em síntese assimétricas, *Quim. Nova*, 18(5), **1995**, 452-459.
- 20.Vaijayanthi, T.; Chadha, A.; Asymmetric reduction of aryl imines using *Candida parapsilosis* ATCC 7330, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, **2008**, 93-96.
21. Andrade, L.H.; Piovan, L.; Paquini, M.D.; Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent; *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, **2009**, 1521-1525.
- 22.Fernandes, S.C.; de Oliveira, I.R.W.Z.; Vieira, I.C.; A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. *Enzyme Microb. Technol.*, 7340, **2006**, 1-8.
23. Vecchia, R. D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros; *Quím. Nova*, 27(4), **2004**, 623-630.
- 24.Volpato, G.; Filice, M.; Rodrigues, R.C.; Heck, J.X.; Guisan, J.M.; Mateo, C.; Ayub, M.A.Z.; Modulation of lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques, *J. Mol. Catal. B.: Enzym.*, 60, **2009**, 125-132.
- 25.Léon, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H.M.; Cabral, J.M.S.; Whole-cell biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 23, **1998**, 483-500.
- 26.Baraldi, P.T.; Corrêa, A.G.; O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, Na síntese de feromônios, *Quim. Nova*, 27(3), **2004**, 421-431.
27. [www.bio.davidson.edu/Bossie/yeastimages.jpg](http://www.bio.davidson.edu/Bossie/yeastimages.jpg), acessado em 26/10/2009.
- 28.Chu, Y.; Zhang, B.L.; Silvestre, V.; Cheng, J.P.; Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone mediated by baker's yeast, *Bioorg. Chem.*, 34, **2006**, 158-166.
- 29.Albuquerque, P.M.; Witt, M.A.; Stambuk, B.U.; Nascimento, M.G.; Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent, *Process Biochem.*, 42, **2007**, 141-147.
- 30.Kawai, Y.; Hayashi, M.; Inaba, Y.; Saitou, K.; Ohno, A.; Asymmetric reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast, *Tetrahedron: Asymmetry*, 39, **1998**, 5225-5228.
- 31.Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M.; Substâncias Carboniladas e Derivados, Porto Alegre: Brookman, **2003**, pgs 319-322.
- 32.Zagozda, M.; Plekiewicz, J.; Enantioselective reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* and *Rhodotorula rubra* yeast, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, **2006**, 1958-1962.
- 33.Assunção, J.C.C.; Machado, L.L.; Lemos, T.L.G.; Cordell, G.A.; Monte, F.J.Q.; Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds, *J. Mol. Catal. B.: Enzym.*, 52-53, **2008**, 194-198.



- 34.Kawai, Y.; Saitou, K.; Hida, K.; Dao, D.H.; Onho, A.; Stereochemical control in microbial reduction. XXVIII. Asymmetric reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones with baker's yeast, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69, **1996**, 2633-2638.
- 35.Zeynizadeh, B.; Behyar, T.; Fast and efficient method for reduction of carbonyl compounds with  $\text{NaBH}_4/\text{WetSiO}_2$  under solvent free condition, *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6A), **2005**, 1200-1209.
- 36.Zhou, Y.; Gao, G.; Li, H.; Qu, J.; A convenient method to reduce hydroxyl-substituted aromatic carboxylic acid with  $\text{NaBH}_4/\text{MeSO}_4/\text{B(OMe)}_3$ , *Tetrahedron Lett.*, 49, **2008**, 3260-3263.
- 37.Vogel., A.I.; Química Orgânica Análise Orgânica Qualitativa, v.2 e 3, 3ªEd., Ao Livro Técnico S.A., Rio de Janeiro, **1971**, pgs 755-756 e 926-927.
- 38.Fairlamb, I.J.S.; Kapdi, A.R.; Lee, A.F.;  $\eta^2$ -dba Complexes of Pd(0): The Substituent Effect in Suzuki–Miyaura Coupling; *Org. Lett.*, 6(24), **2004**, 4435-4438.
- 39.Giasuddin, A.M.; Asghari, A.S.; Romman, U. K. R.; Mosaddeq, A.S.; Khabir, U.M.; Synthesis and characterization of some 1,5-diaryl-1,4-pentadien-3-ones, *J Sci.*, 53(1), **2005**, 119-125.
- 40.Sompong, W.; Murphy, W. S.; An improved procedure for the preparation of chalcones and related enones, *J. Sci.*, 8, **1980**, 647-50.
- 41.Silverstein, R. M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 3ªEd, **1974**.

## 9. ANEXO

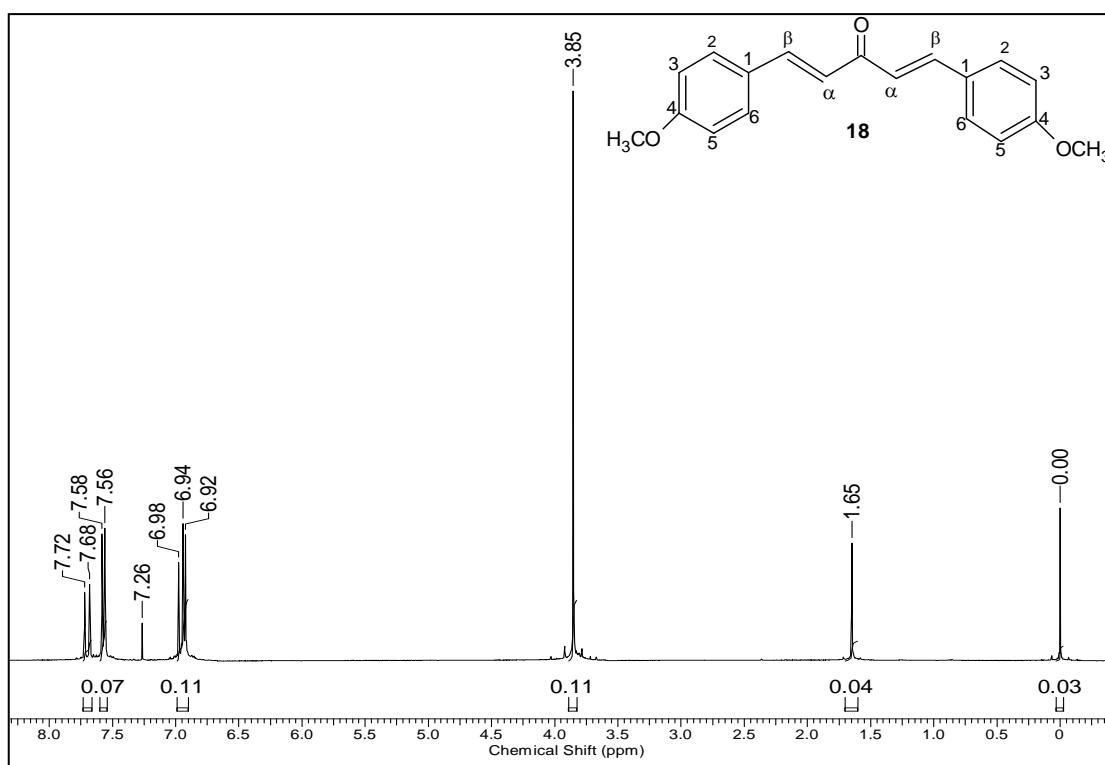


Figura 26- Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da dibenzalacetona **18**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]

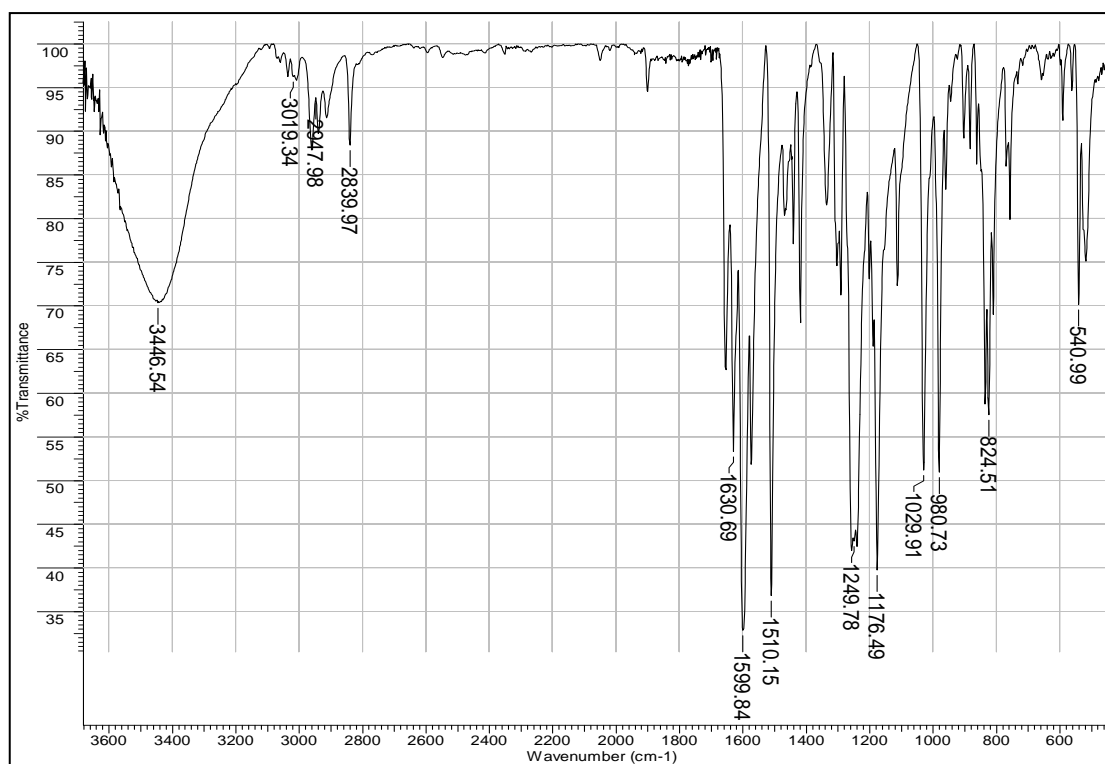
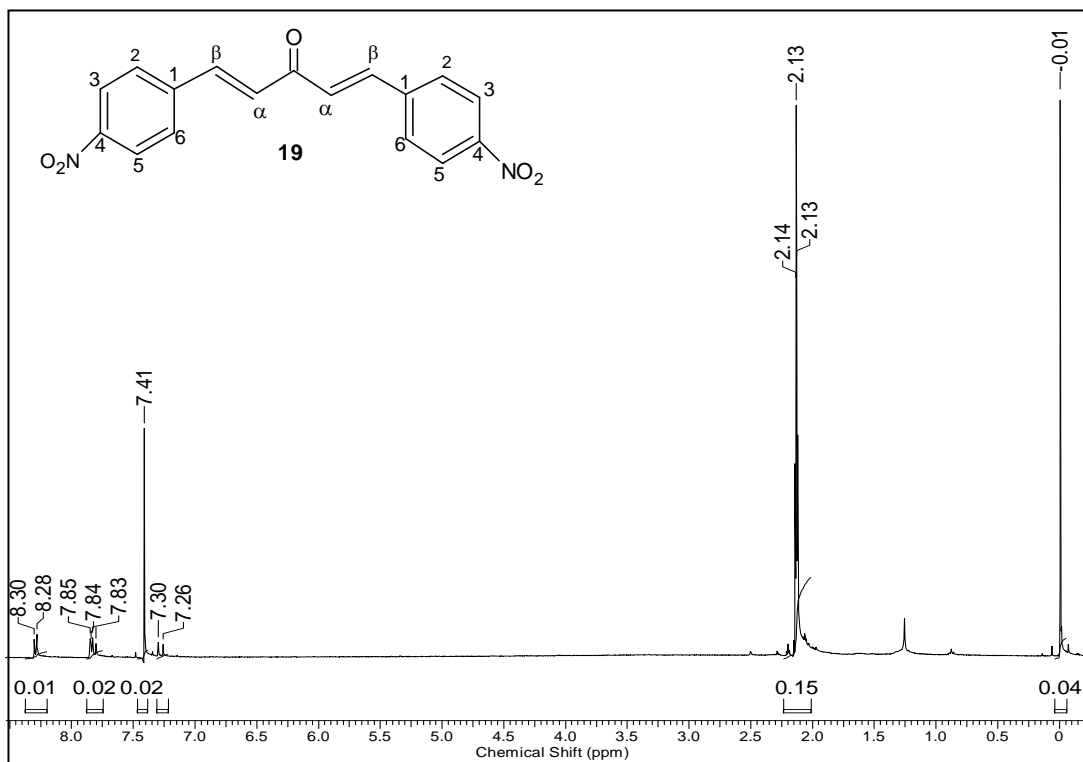
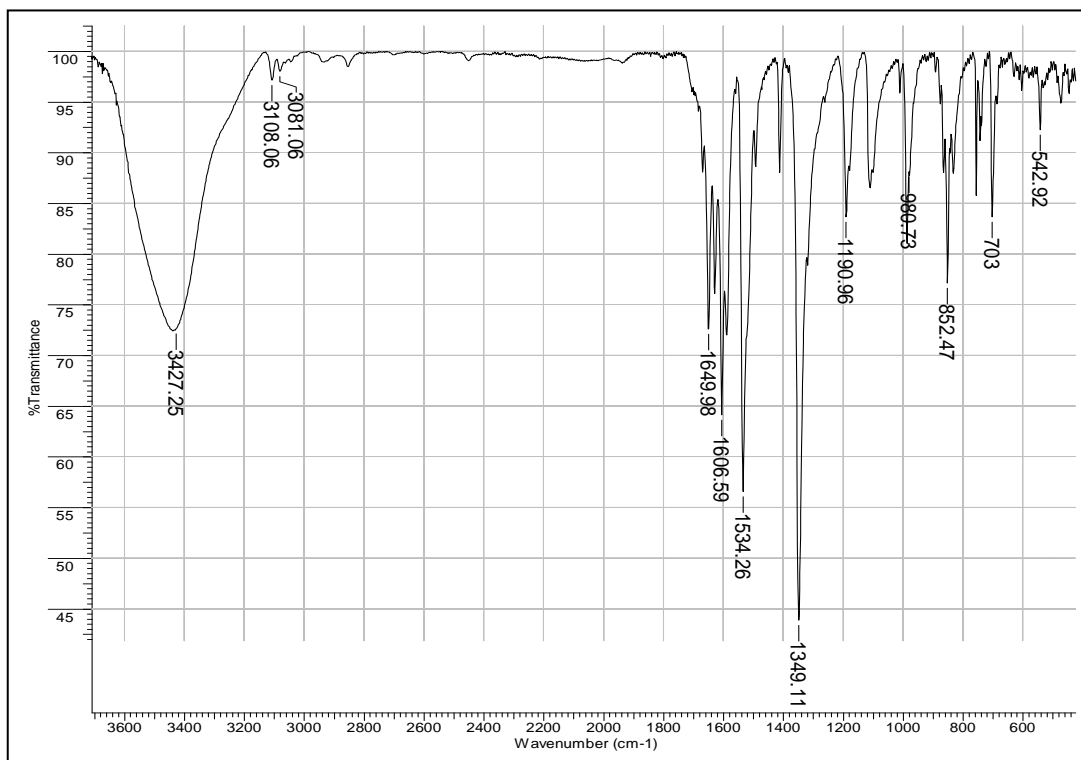


Figura 27- Espectro de IV da dibenzalacetona **18**. [pastilha de KBr]



**Figura 28-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da dibenzalacetona **19**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]



**Figura 29-** Espectro de IV da dibenzalacetona **19**. [pastilha de KBr]

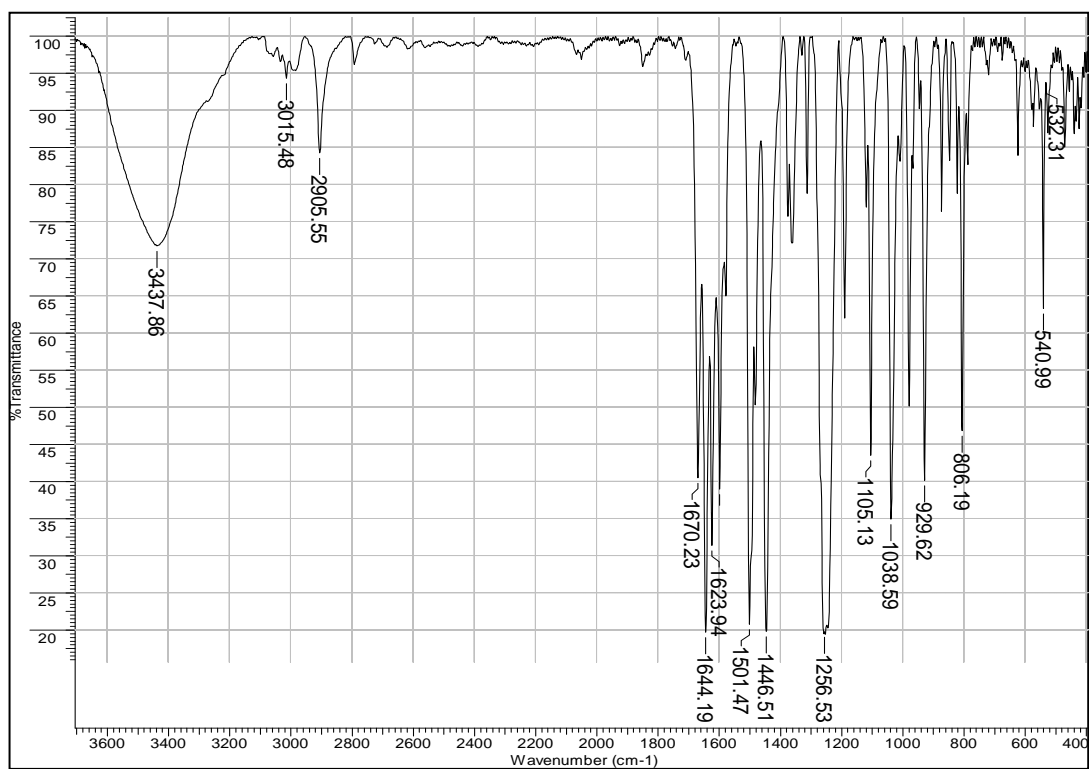


Figura 30- Espectro de IV da dibenzalacetona **20**. [pastilha de KBr]

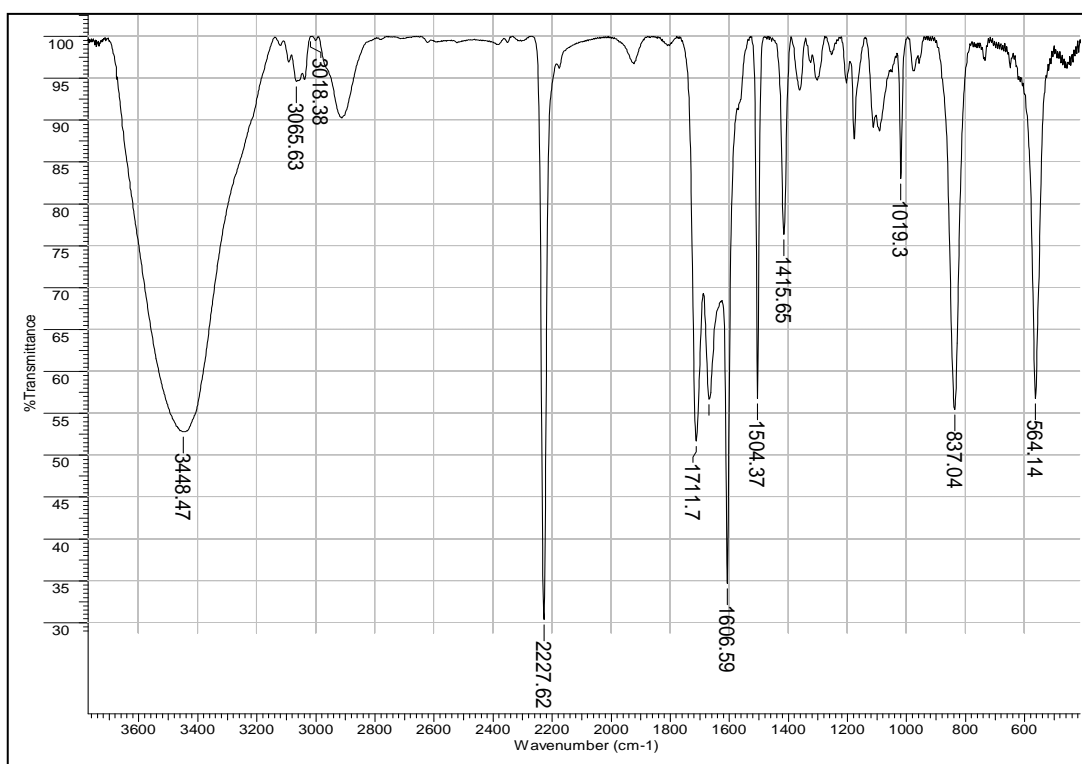
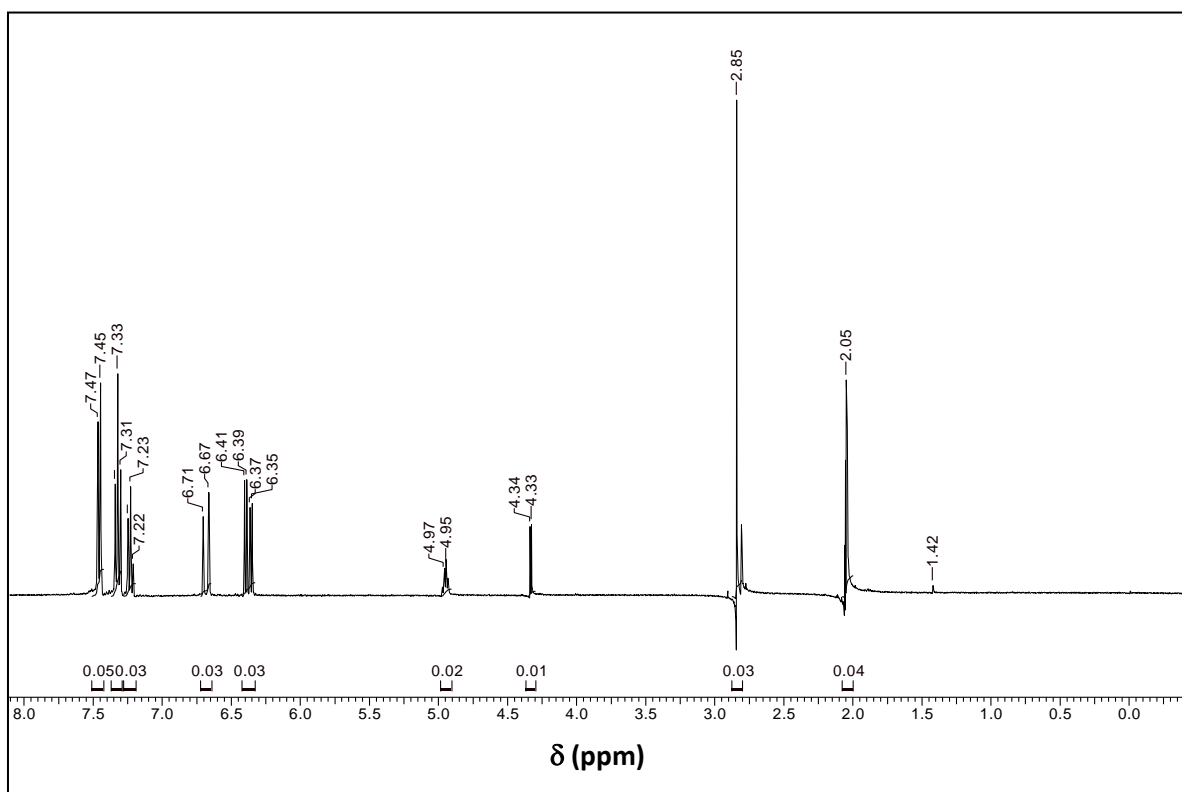
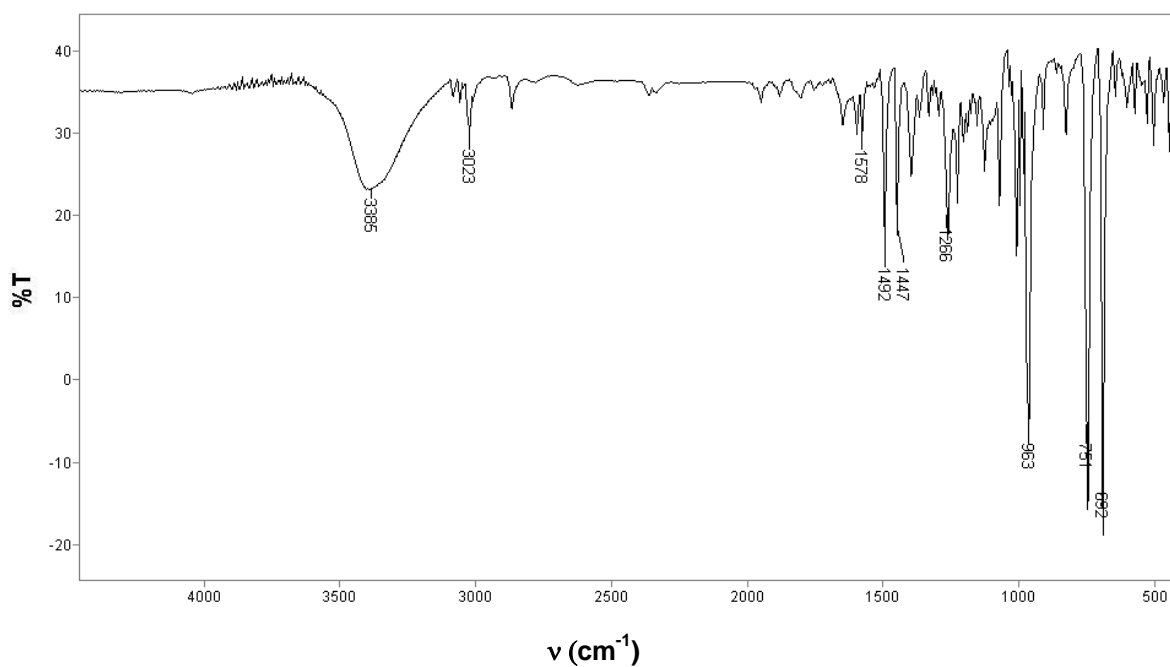


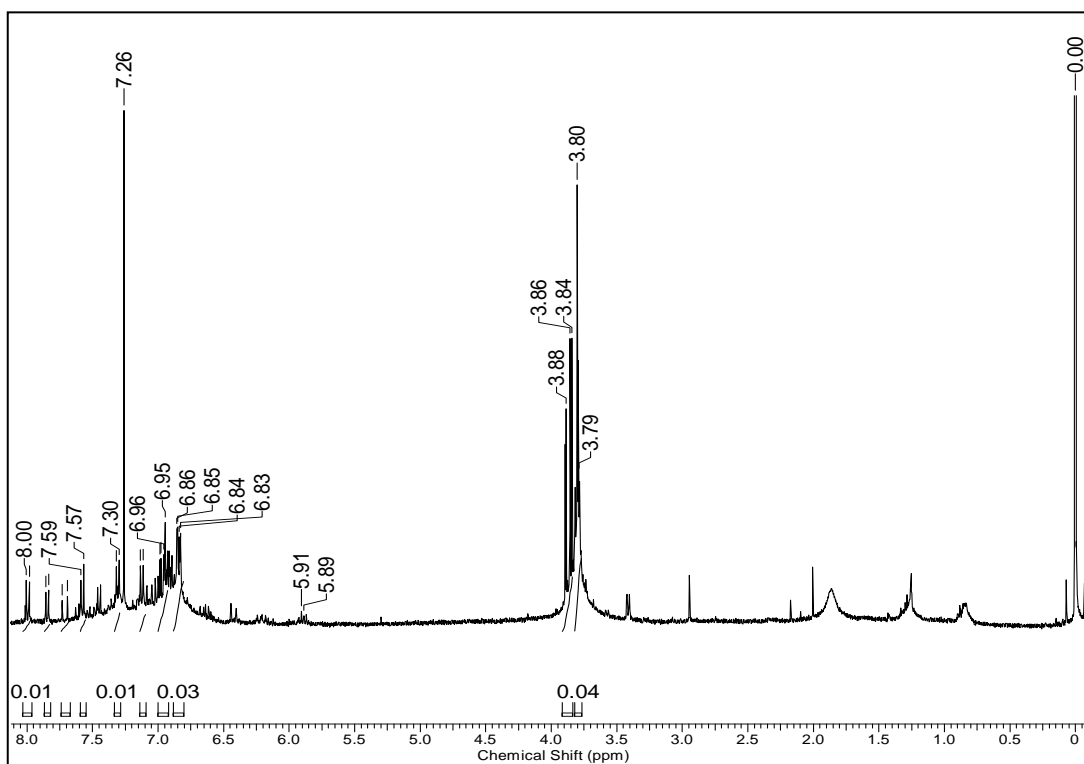
Figura 31- Espectro de IV da dibenzalacetona **21**. [pastilha de KBr]



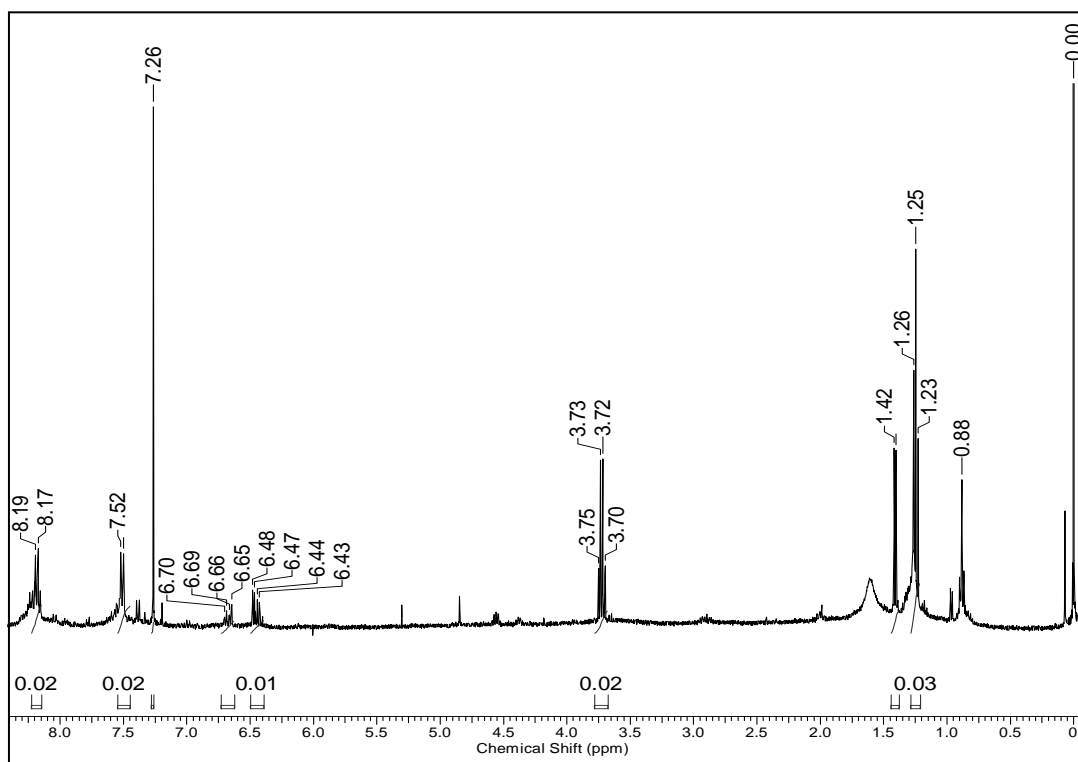
**Figura 32-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do álcool **22**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]



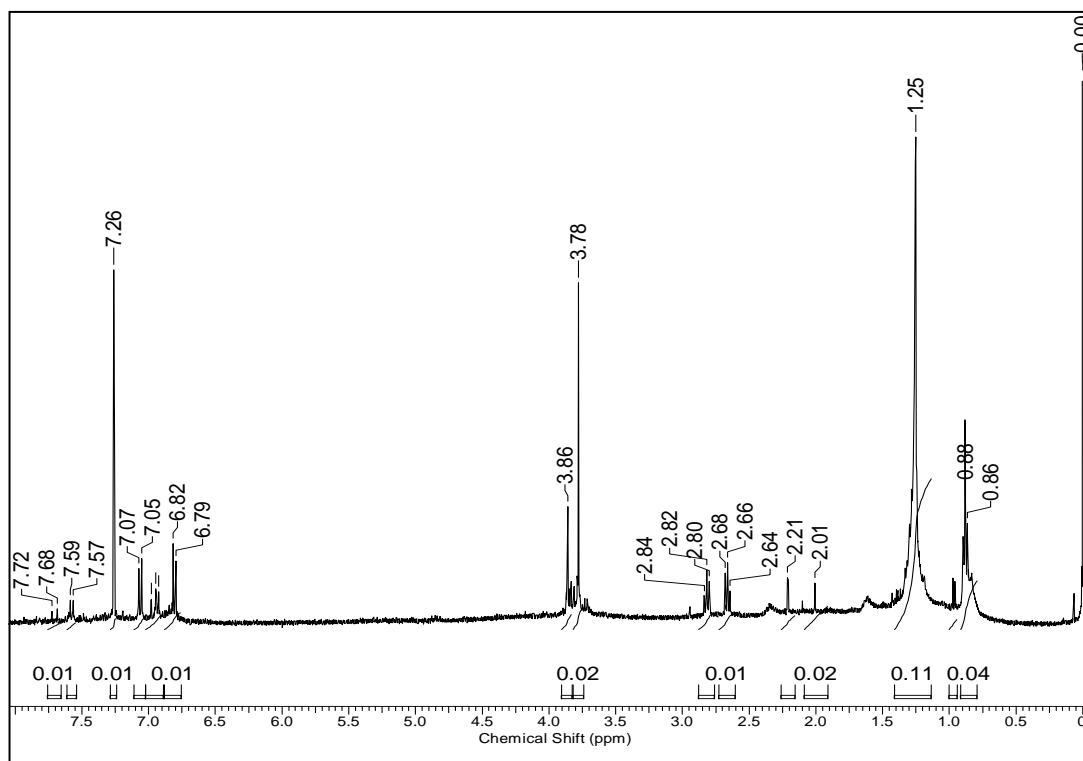
**Figura 33-** Espectro de IV do álcool **22**. [pastilha de KBr]



**Figura 34-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do álcool **23**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]



**Figura 35-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do álcool **24**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]



**Figura 36-** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da bio-hidrogenação de **18**. [ $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz]

Como resultado do trabalho desenvolvido até a presente data, será apresentado 1 (um) trabalho no XVII Encontro de Química da Região Sul (18 a 20 de novembro de 2009 – Rio Grande – RS).

A cópia do mesmo está anexada, a seguir:

## Bio-hidrogenação da 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Kamila S. Maguerroski\* (IC), Vanessa D. Silva (PG), Maria G. Nascimento (PQ)

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 Florianópolis - SC

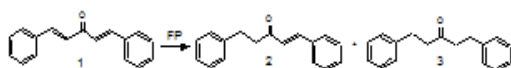
Tel./Fax: +55-48-37219968; e-mail: kmilaskm@gmail.com

**Palavras Chave:** Biocatálise, *Saccharomyces cerevisiae*, compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

### Introdução

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento de pão (FP), é um dos biocatalisadores mais utilizados pelos químicos orgânicos, devido principalmente a sua alta disponibilidade e baixo custo. Outras vantagens tais como alta seletividade, facilidade de manuseio e alta eficiência em relação aos catalisadores tradicionais, proporcionam o crescente interesse das pesquisas na área acadêmica e industrial. Esta levedura vem sendo utilizada na redução dos compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados e de outros substratos, para formar produtos com alta seletividade.<sup>1,2,3</sup>

No presente trabalho realizou-se a bio-hidrogenação da 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**1**) mediada pela levedura *S. cerevisiae* em sistema bifásico. Foram avaliadas a quantidade de FP e a concentração do substrato (Equação 1).

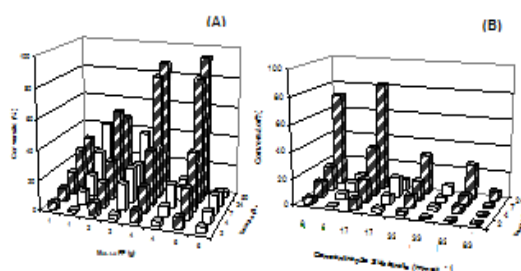


Eq. 1

### Resultados e Discussão

Primeiramente, estudou-se o efeito da massa de FP (1, 2, 4, 6g) na reação de bio-hidrogenação de **1** (162mg, 1mmol) em sistema bifásico (30mL de *n*-hexano, 30mL de solução tampão ácido cítrico/ $K_2HPO_4$ , pH 5,5) durante 50h. Foram retiradas alíquotas periodicamente, e analisadas por cromatografia gasosa (CG) com fase quiral (Restek RT-BetaDex) e CG acoplada a espectrômetro de massas (J & W Cientific DB-5-M30). O composto **1** foi preparado, purificado e caracterizado conforme descrito na literatura.<sup>4</sup>

As análises de CG-quiral e CG-MS mostraram 3 picos distintos que são referentes ao substrato **1** (14,9min,  $m/z$  = 233) e aos produtos de bio-hidrogenação 1,5-difenil-1-penten-3-ona (**2**) (10,5min,  $m/z$  = 236) e 1,5-difenil-3-pentanona (**3**) (8,3min,  $m/z$  = 238). O produto **3** foi obtido em maior porcentagem.



**Figura 1.** Efeito da quantidade de FP (A) e da concentração do substrato (B) na reação de bio-hidrogenação de **1** em **2** (□) e **3** (■). [sistema bifásico; pH 5,5; 35°C]

As maiores conversões em **3** foram obtidas quando as reações foram realizadas com 4 e 6g de FP em 24 e 50h, sendo de 82-94% (Figura 1A). A partir destes dados, os estudos subsequentes foram realizados com 4g FP.

A seguir, avaliou-se o efeito da concentração do substrato (8, 17, 33, 83mmol·L<sup>-1</sup>), na bio-hidrogenação de **1** (Figura 1B). A maior conversão em **3** foi obtida com 17mmol·L<sup>-1</sup> de substrato em 24h de reação, sendo de 82%.

### Conclusões

A bio-hidrogenação da 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona (**1**) mediada por *S. cerevisiae* foi regioseletiva formando apenas os produtos de hidrogenação das ligações C=C. A reação foi dependente da massa de fermento de pão e da concentração do substrato.

### Agradecimentos

UFSC, CNPq e CAPES.

\* Rodrigues, J.A.R.; Moran, P.J.S., *Quim. Nova*, 2001, 24(6), 893-897.

<sup>2</sup> Araque, E.; Parra, C.; Rodríguez, M.; Freer, J.; Baeza, J., *Enzym. Microb. Technol.*, 2008, 43, 120-123.

<sup>3</sup> Chu, Y.; Zhang, B.L.; Silvestre, V.; Cheng, J.P., *Bioorg. Chem.*, 34, 2006, 158-166.

<sup>4</sup> Vogel, A.I., *Química Orgânica Análise Orgânica Qualitativa*, v.2 e 3, 3ªEd., 1971, pgs. 755-756 e 926-927.